

„Stabilität und Plastizität der IL-17-Expression in
T_H17-Zellen und
die regulatorische Funktion von IL-17 in einem
Infektionsmodell“

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

eingereicht an der

Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät

der

Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Dipl.-Biol. Annegret Taubner

geboren am 23. August 1980 in Lichtenstein

Jena, 2011

Gutachter:

1. Prof. Dr. Falk Weih
Leibniz-Institut für Altersforschung, Jena
2. Prof. Dr. Thomas Kamradt
Institut für Immunologie, Friedrich-Schiller-Universität, Jena
3. Prof. Dr. Gottfried Alber
Institut für Immunologie, Universität Leipzig

Tag der öffentlichen Verteidigung: 29.Mai 2012

*« Les plus belles années d'une vie
sont celles que l'on n'a pas encore
vécues . »*

Victor Hugo

1. EINLEITUNG	1
1.1. Einteilung der T-Helferzellen	1
1.2. T _H 17-Zellen als T-Helferzellpopulation	3
1.2.1. Regulation der T _H 17-Differenzierung durch Zytokine	3
1.2.2. Transkriptionelles regulatorisches Netzwerk der T _H 17-Zellen	6
1.3. Effektorzytokine der T _H 17-Zellen	8
1.4. IL-17 als Effektorzytokin weiterer Zelltypen	10
1.5. Die Funktion von IL-17	11
1.5.1. Die Rolle von IL-17 in Autoimmunerkrankungen	12
1.5.2. Die Rolle von IL-17 in Infektionen	13
1.6. Zielsetzung der Arbeit	14
2. MATERIAL	15
2.1. Biologisches Material	15
2.1.1. Mäuse	15
2.1.2. Viren/ Bakterien	15
2.2. Chemikalien, Kits und Verbrauchsmaterialien	15
2.2.1. Chemikalien	15
2.2.2. Kits	15
2.2.3. Verbrauchsmaterialien	16
2.3. Antikörper	16
2.3.1. Antikörper für Sortierung von Zellen mittels MACS® und ARIA	16
2.3.2. Antikörper für Färbung der Zellen im FACS	17
2.3.3. Antikörper für Immunhistochemie	18
2.3.4. Antikörper für Isotypspezifischen <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)	18
2.3.5. Antikörper für Zellkultur	18
2.3.6. Antikörper für <i>in vivo</i> Experimente	19
2.4. Peptide/ Proteine	19
2.5. Zytokine	19
2.6. Primer	19
2.7. Geräte	20
3. METHODEN	21
3.1. Methoden der Proteinbiochemie	21
3.1.1. Isotyp-spezifischer <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA)	21
3.2. Methoden der Zellbiologie	21
3.2.1. Zellkultur	21
3.2.2. Gewinnung von Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten (LK)	22
3.2.3. Gewinnung von Zellen aus dem Zentralen Nervensystem (ZNS) und der Lunge	22
3.2.4. <i>In vitro</i> Generierung von <i>Bone Marrow-derived Dendritic Cells</i> (BMDCs)	23
3.2.5. Herstellung und Kultur muriner T-Zelllinien	23
3.2.6. Durchflusszytometrie/ FACS	23
3.2.6.1. Oberflächenfärbung	24
3.2.6.2. Intrazelluläre Färbung	25

3.2.6.3. Färbung von Antigen-spezifischen T _H -Zellen über CD154.....	26
3.2.7. Sortierung von Zytokin-produzierenden Zellen mittels <i>Cytokine Secretion Assay (CSA)</i> im FACSria	27
3.2.8. Sortierung von Zellen mittels <i>Magnetic Cell Sorting (MACS)</i>	29
3.2.8.1. Sortierung von CD4 ⁺ T-Zellen mittels MACS.....	29
3.2.8.2. Sortierung naiver T _H -Zellen mittels MACS	29
3.3. Methoden der Molekularbiologie	30
3.3.1. Isolation genomischer DNA aus Schwanzbiopsien	30
3.3.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Genotypisierung der C57BL/6_IL-17 ko Mäuse	31
3.3.3. Nachweis der Viruslast in der Lunge Influenzavirus-infizierter Mäuse	32
3.3.4. Nachweis der mRNA-Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren mittels RT-PCR	32
3.3.5. Microarray	32
3.3.5.1. RNA-Isolation aus Lungengewebe	32
3.3.5.2. Konzentrationbestimmung und Qualitätskontrolle der isolierten RNA.....	32
3.3.5.3. Aliquotierung der RNA für die Amplifikation	33
3.3.5.4. Charakteristik des eingesetzten Microarrays.....	33
3.3.5.5. RNA-Amplifikation und Labeling	33
3.3.5.6. Hybridisierung, Färben und Waschen der Microarrays	34
3.3.5.7. Statistische Analysen und bioinformatische Analysen	34
3.4. Tierversuche	34
3.4.1. Induktion der G6PI-induzierten Arthritis	34
3.4.2. Induktion einer Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE)	35
3.4.3. Infektion mit Influenzavirus.....	35
3.4.4. Sekundäre bakterielle Infektion mit <i>Streptococcus pneumoniae</i>	35
3.4.5. Intraperitoneale Applikation von Antikörpern	36
3.5. Histologie	36
3.5.1. Aufarbeitung der Lunge für histologische Untersuchungen.....	37
3.5.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E-Färbung)	37
3.5.3. Immunhistologie	37
3.5.3.1. Vorbereitung der Paraffinschnitte mittels Trypsin-Verdau	38
3.5.3.2. ABC-Methode	38
3.5.3.3. Gegenfärbung mit Hämatoxylin	38
3.6. Statistische Auswertung	38
4. ERGEBNISSE	39
4.1. Stabilität und Plastizität von T_H17-Zellen	39
4.1.1. Stabilität und Plastizität von T _H 17-Zellen <i>in vitro</i>	39
4.1.2. Stabilität und Plastizität von T _H 17-Zellen <i>ex vivo</i>	41
4.1.2.1. Stabilität und Plastizität von T _H 17-Zellen <i>ex vivo</i> G6PI-immunisierter Mäuse	41
4.1.2.2. Stabilität und Plastizität von T _H 17-Zellen <i>ex vivo</i> MOG ₃₅₋₅₅ -immunisierter Mäuse	45
4.1.2.2.1. Stabilität und Plastizität von T _H 17-Zellen isoliert aus MOG ₃₅₋₅₅ -immunisierten Mäusen in der Induktionsphase	47
4.1.2.2.2. Stabilität und Plastizität von T _H 17-Zellen isoliert aus MOG ₃₅₋₅₅ -immunisierten Mäusen in der Effektorphase	51
4.2. IL-17 als Regulator der Immunpathologie im Influenzavirus Infektionsmodell	54
4.2.1. Infiltration neutrophiler Granulozyten nach IL-17-Produktion in Influenzavirus-infizierten Mäusen	54
4.2.2. IL-17 – Blockade in Influenzavirus-infizierten Mäusen	61
4.2.2.1. Auswirkung der anti-IL-17-Applikation auf Gewicht, Überleben und Viruslast in der Lunge	61
4.2.2.2. Auswirkung der anti-IL-17-Applikation auf die Infiltration neutrophiler Granulozyten.....	64
4.2.2.3. Auswirkung der anti-IL-17-Applikation auf die Immunpathologie	65
Gruppe	67
4.2.2.4. Auswirkung der anti-IL-17-Applikation auf das adaptive Immunsystem nach Influenzavirus Infektion	68
4.2.2.5. Auswirkung der anti-IL-17-Applikation auf das Transkriptom der H1N1-infizierten Mäuse..	71

4.2.2.5.1. Qualitätskontrolle und Normalisierung der Microarrays	72
4.2.2.5.2. Statistische Analysen und biologische Zusammenhänge	73
4.2.3. Influenzavirus Infektion in IL17 <i>knockout</i> Mäusen	79
4.2.4. Auswirkung der anti-IL-17-Applikation auf eine sekundär bakterielle Infektion	80
5. DISKUSSION	83
5.1. Zusammenfassung.....	83
5.2. Stabilität und Plastizität von T_H17-Zellen	84
5.2.1. Die Plastizität von <i>in vitro</i> generierten T _H 17-Zellen.....	84
5.2.2. Plastizität von T _H 17-Zellen isoliert aus Autoimmunmodellen.....	86
5.3. Die Rolle des proinflammatorischen Zytokins IL-17 in einem Influenzavirus Infektionsmodell.....	89
5.3.1. IL-17-Expression in den Lungen H1N1-infizierter Mäuse	90
5.3.2. Die pathologische Relevanz der IL-17 – Blockade in H1N1-infizierten Mäusen	92
5.3.3. IL-17 – Blockade reduziert die Anzahl der IFN- γ -Produzenten in H1N1-infizierten Mäusen	94
5.3.4. Die Bedeutung der antiviralen Proteine in H1N1-infizierten Mäusen nach IL-17 – Blockade	96
5.3.5. Influenza Virusinfektion in IL-17 <i>knockout</i> Mäusen	98
5.3.6. IL-17 – Blockade in einer Koinfektion von Influenza A Virus und <i>Streptococcus pneumoniae</i> ...	98
5.4. Ausblick.....	99
SUMMARY	101
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	102
LITERATURVERZEICHNIS	105
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	122
TABELLENVERZEICHNIS	124
WISSENSCHAFTLICHE BEITRÄGE	125
DANKSAGUNG	126
EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	127

1. EINLEITUNG

Die Hauptfunktion des Immunsystems ist der Schutz des Organismus vor Infektionen. Selbst niedere Organismen besitzen ein angeborenes oder unspezifisches Immunsystem. Die Effektivität des angeborenen Immunsystems in höheren Organismen ist limitiert – u.a. aufgrund der Komplexität des Körpers. Somit besitzen Wirbeltiere zusätzlich ein erworbenes bzw. adaptives Immunsystem, welches noch effektiver vor Krankheitserregern schützt und ein sogenanntes Gedächtnis besitzt. Dadurch kann nach einem erneuten Kontakt mit demselben Erreger eine schnellere und effizientere Immunantwort erfolgen. T- und B-Zellen sind typische Vertreter der erworbenen zellulären Immunabwehr. Das erworbene Immunsystem beruht auf der somatischen Generation einer Vielzahl an unterschiedlichen Rezeptoren. Während der Immunglobulin (Ig) Rezeptor der B-Zellen intakte Antigene bindet, erkennt der T-Zell-Rezeptor (TZR) kurze Peptidfragmente nur in Kombination mit hoch polymorphen Haupthistokompatibilitätskomplexen (MHC-Moleküle, engl. *Major Histocompatibility Complex*). Dabei wird zwischen zwei Klassen an MHC-Molekülen unterschieden. Peptidfragmente von intrazellulären Erregern wie Viren oder Bakterien werden von MHC-I Molekülen präsentiert und von allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Der Komplex aus Peptid und MHC-I wird von den zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen erkannt, die schließlich infizierte Zellen abtöten. MHC-II Moleküle dagegen präsentieren extrazelluläre Antigene. Diese werden mithilfe Endozytose in die Zellen aufgenommen und prozessiert. MHC-II Moleküle werden von Antigen-präsentierenden Zellen (APCs, engl. *antigen presenting cells*) des Immunsystems wie Dendritische Zellen (DCs), Makrophagen und B-Zellen exprimiert und von $CD4^+$ T-Helferzellen (T_H -Zellen) erkannt. T_H -Zellen aktivieren B-Zellen zur Antikörperproduktion und beeinflussen somit die humorale Immunantwort. Ferner werden durch $CD4^+$ T-Zellen auch Makrophagen aktiviert.

1.1. Einteilung der T-Helferzellen

Seit der Beschreibung des $T_H1 - T_H2$ -Paradigma vor über 20 Jahren von Mosmann und Coffman werden T_H -Zellen anhand ihres Zytokinprofils sowie der spezifischen Expression von Transkriptionsfaktoren eingeteilt [1-3]. Als eine der ersten beschriebenen T_H -Zellen gelten T_H1 -Zellen. Sie exprimieren neben dem charakteristischen T_H1 -Zytokin Interferon- γ (IFN- γ) auch Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und den Transkriptionsfaktor T-bet. Die Hauptfunktion von T_H1 -Zellen besteht in der Abwehr von extrazellulären Erregern. T_H2 -Zellen wurden zur gleichen Zeit beschrieben wie T_H1 -Zellen. T_H2 -Zellen exprimieren Interleukin-4 (IL-4), IL-5 und IL-13 sowie den Transkriptionsfaktor GATA-3. Die Funktion der T_H2 -Zellen besteht in der Abwehr extrazellulärer Pathogene und in der Aktivierung von B-Zellen zur Antikörperproduktion.

Die Differenzierung von naiven $CD4^+$ T-Zellen in Effektorzellen wird ausgelöst durch die Aktivierung des T-Zell-Rezeptors und kostimulatorischen Signalen in Anwesenheit von Zytokinen (Abb.1). Diese Zytokine werden im Allgemeinen von Zellen der angeborenen Immunabwehr produziert. Dabei führt die Produktion von IFN- γ und IL-12 zur Differenzierung von T_H1 -Zellen. Im Gegensatz dazu löst IL-4 die Differenzierung von T_H2 -Zellen aus.

In den letzten 20 Jahren wurden neue Subtypen von T-Effektorzellen beschrieben. 1995 wurde von Sakaguchi *et al.* eine $CD4^+CD25^+$ T-Zellpopulation identifiziert, die regulatorische Fähigkeiten besitzt und Immunantworten inhibieren bzw. regulieren kann [4]. Diese Zellen wurden schließlich als regulatorische T-Zellen (Tregs) bezeichnet. Die Charakterisierung des Transkriptionsfaktors *Forkhead-Box-Proteins 3*

(Foxp3) im Jahr 2003 führte zu wichtigen Erkenntnissen über Entwicklung, Funktion und Homeostase der Tregs [5-7]. Regulatorische T-Zellen werden in natürliche Tregs (nTregs) und induzierte Tregs (iTregs) unterteilt [8]. Während die Induktion von nTregs im Thymus erfolgt, entstehen iTregs aus naiven $CD4^+$ T-Zellpopulationen oder nTregs in der Peripherie.

Bereits im Jahr 2000 wurden IL-17-produzierende $CD4^+$ T-Zellen charakterisiert [9], die jedoch erst 2005 als eigenständige Zellpopulation mit der Bezeichnung T_H17 -Zellen beschrieben wurden [10, 11]. Durch die Identifizierung von Zytokinen und Transkriptionsfaktoren, die von T_H17 -Zellen gebildet werden, etablierten sich diese Zellen als eine distinkte Population von T_H -Zellen. Bereits 1995 wurde von Yao *et al.* eine Aminosäure-Sequenzhomologie von 57 % zwischen dem Herpesvirus Saimiri Gen 13 (HVS13) und IL-17A beschrieben [12]. Dabei wurde gezeigt, dass rekombinantes HVS13 und IL-17A NF- κ B aktivieren, die IL-6-Produktion in Fibroblasten stimulieren sowie die T-Zellproliferation kostimulieren können. Zusätzlich konnte komplementäre DNA (cDNA) isoliert werden, die für einen neuen Rezeptor kodiert und in der Lage ist, IL-17A zu binden. Dieser Rezeptor konnte nicht in bereits definierte Zytokinrezeptorfamilien eingeordnet werden und wurde daraufhin als IL-17-Rezeptor (IL-17R) bezeichnet.

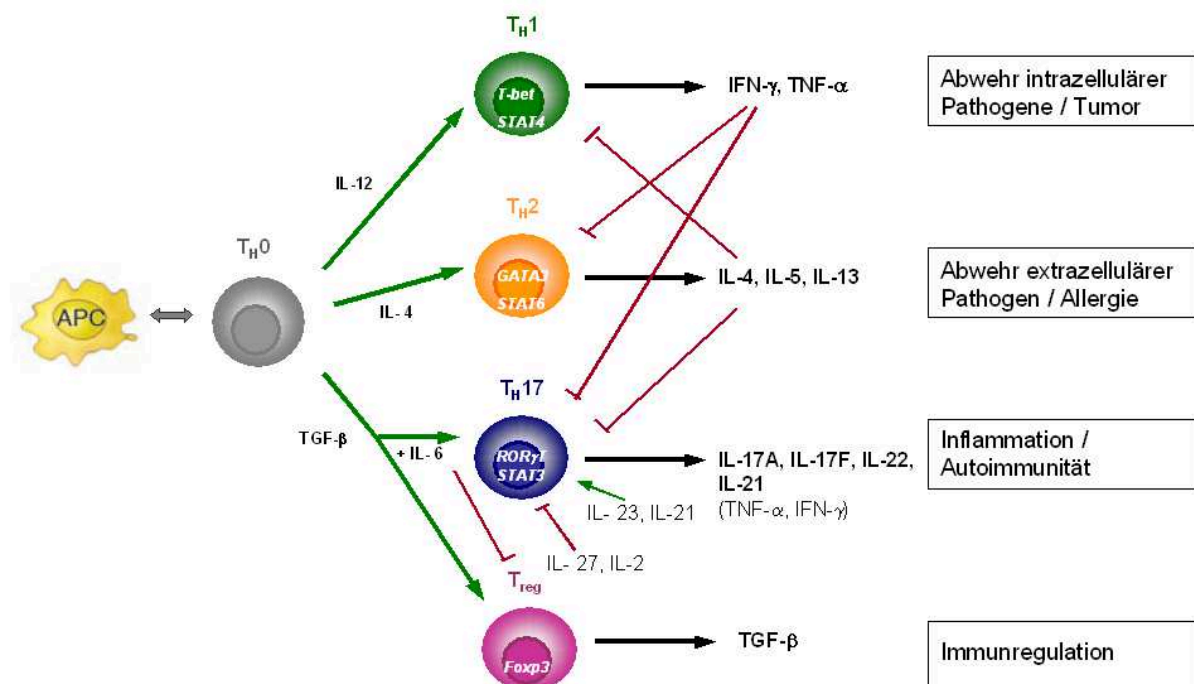


Abb. 1. Darstellung der verschiedenen T-Helferzell-Subpopulationen. Die Aktivierung von naiven T-Zellen (T_H0) erfolgt über die Bindung des TZR an den MHC-II/Peptid-Komplex sowie über kostimulatorische Signale durch Antigenpräsentierende Zellen. In Abhängigkeit des Zytokinmilieus können sich die T_H -Zellen zu T_H1 -, T_H2 -, T_H17 - oder regulatorischen (Treg) T-Zellen entwickeln (grüne Pfeile). Charakterisiert werden die einzelnen T-Zell-Subpopulationen über spezifische Transkriptionsfaktoren und Effektorzytokine (schwarze Pfeile). Die Differenzierung der Zellpopulationen kann sich gegenseitig über deren Effektorzytokine inhibieren (rote Linien). Jede Population übernimmt im Immunsystem eine spezielle Aufgabe, die vor allem durch die Effektorzytokine hervorgerufen wird. (Quelle: freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Sylvia Heink).

Infante-Duarte *et al.* konnten fünf Jahre später IL-17 als Zytokin von $CD4^+$ T-Zellen nach Stimulation mit dem Lysat von *Borrelia burgdorferi in vitro* nachweisen [9]. In dieser Publikation wurde bereits vermutet,

dass IL-6 eine entscheidende Rolle in der Entwicklung dieser IL-17-produzierenden CD4⁺ T-Zellen besitzt.

Neben den bereits genannten T-Zellpopulationen wurden noch weitere Klassen an T-Zellen beschrieben. Follikuläre T_H-Zellen (T_{FH}-Zellen) sind in B-Zellfollikeln zu finden und spielen eine wichtige Funktion bei der Entwicklung hoch-affiner Antikörper und des B-Zellgedächtnisses [13]. Obwohl alle CD4⁺ T-Zellen durch B-Zellfollikel zirkulieren, befinden sich T_{FH}-Zellen aufgrund der konstanten Expression des Chemokinrezeptors CXCR5 dauerhaft in diesen Arealen der Lymphknoten [14]. CXCR5-positive CD4⁺ T-Zellen besitzen das Potential T_H1-, T_H2- oder T_H17-Zytokine zu produzieren. Demzufolge stellt sich die Frage, ob T_{FH}-Zellen als distinkte T-Zellpopulation bezeichnet werden können.

Im Jahr 2008 konnte gezeigt werden, dass TGF-β die Konvertierung von T_H2-Zellen zu IL-9-produzierenden T-Zellen auslöst [15]. IL-9 wurde zunächst als T_H2-Zytokin bezeichnet. Jedoch wird IL-9 nicht mit den typischen T_H2-Zytokinen IL-4, IL-5 oder IL-13 koexprimiert. Obwohl es Hinweise gibt, dass auch T_H17-Zellen IL-9 produzieren, wird IL-9 nicht gemeinsam mit IL-17 oder IL-22 exprimiert. Da T_H9-Zellen nur *in vitro* beschrieben werden konnten, ist nicht bewiesen ob diese Zellen auch *in vivo* existent sind. Eventuell sind IL-9-produzierende Zellen lediglich als eine Anpassung von T_H2-Zellen zu sehen.

2009 wurden humane T_H22-Zellen beschrieben, die kein IL-17 exprimieren, in der Haut lokalisiert sind und in Entzündungen wie Psoriasis eine wichtige Funktion einnehmen [16]. Diese Zellpopulation wurde bisher allerdings nicht im murinen System beschrieben.

Die Auffassung, dass T-Effektorzellen terminal differenzierte Zelllinien repräsentieren, basiert auf einer Vielzahl von *in vitro* Experimenten. Wenn naive CD4⁺ T-Zellen zu T_H1- oder T_H2-Zellen differenziert sind, ist der Phänotyp dieser Zellen nicht mehr reversibel – auch nicht unter neuen polarisierenden Bedingungen [17]. Desweiteren ist eine stabile Zytokinproduktion unter polarisierenden Bedingungen nur nach mehreren Zellteilungen zu beobachten. Das bedeutet, dass für die Etablierung einer terminal differenzierten Subpopulation ein stabiles transkriptionelles Programm notwendig ist [18, 19].

Im Laufe der Zeit wurde jedoch klar, dass die konsequente Einteilung in die T_H-Subpopulationen *in vivo* nicht gegeben ist. Die *in vitro* Differenzierungsbedingungen unterscheiden sich von den *in vivo* Bedingungen und beeinflussen so den Grad der Polarisierung der Zellen.

Während sich die *in vitro* Differenzierung von T_H1- und T_H17-Zellen gegenseitig ausschließt, konnten im inflammatorischen Gewebe von Autoimmunpatienten T_H-Zellen identifiziert werden, die IFN-γ und IL-17 koexprimieren [9, 20, 21]. Diese IFN-γ/IL-17-Doppelproduzenten lassen vermuten, dass in den Differenzierungsprogrammen der T_H1- und T_H17-Zellen komplexe Zusammenhänge existieren.

1.2. T_H17-Zellen als T-Helferzellpopulation

An der Differenzierung muriner naiver CD4⁺ T-Zellen zu T_H17-Zellen sind eine Vielzahl verschiedener Zytokine und Transkriptionsfaktoren beteiligt, deren Funktion in den folgenden Abschnitten näher dargelegt werden soll.

1.2.1. Regulation der T_H17-Differenzierung durch Zytokine

Im Jahr 2006 wurde zum ersten Mal von drei unterschiedlichen Publikationen beschrieben, dass die Kombination, bestehend aus dem immunregulatorischen Zytokin *transforming growth factor-β* (TGF-β)

und dem proinflammatorischen, pleiotropen Zytokin IL-6, die Differenzierung von T_H17-Zellen auslöst [22-24]. TGF- β allein hingegen induziert die Entwicklung naiver T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen (CD25⁺Foxp3⁺), während IL-6 die Expression des Treg-spezifischen Transkriptionsfaktors Foxp3 und somit deren Differenzierung blockiert.

Die ersten Beweise für die Notwendigkeit von **TGF- β** für die Generierung von murinen T_H17-Zellen *in vivo* lieferten Mangan *et al.* im Jahr 2005 [24]. TGF- β -defiziente Mäuse besitzen eine reduzierte Anzahl an T_H17-Gedächtniszellen, während die Anzahl an IFN- γ -exprimierenden Zellen erhöht ist. Dabei ist anzunehmen, dass TGF- β die Differenzierung von T_H1-Zellen blockiert und auf diesem Weg die T_H17-Differenzierung fördert. Die Überexpression von TGF- β in T-Zellen führt außerdem zu einer gesteigerten T_H17-Differenzierung und zu einer T_H17-vermittelten Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) [23]. Die Rolle von TGF- β in der Generierung muriner T_H17-Zellen ist jedoch umstritten. 2010 wurde von Ghoreschi *et al.* gezeigt, dass für die Differenzierung von T_H17-Zellen kein TGF- β *signaling* notwendig ist. Die Differenzierung wird ausgelöst durch die kombinierte Aktivität von IL-1 β und IL-23. TGF- β besitzt durch die Hemmung der Expression von T-bet (T_H1-spezifischer Transkriptionsfaktor) lediglich eine indirekte Funktion [25].

IL-6 wird von diversen Zellen des Immunsystems gebildet. Dazu zählen DCs, Monozyten, Makrophagen, Mastzellen, B-Zellen, z.T. aktivierte T-Zellen aber auch Tumorzellen, Fibroblasten, Endothelzellen und Keratinozyten [26]. Die Bindung von IL-6 an den IL-6-Rezeptor führt über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors *Signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) zur T_H17-Differenzierung. IL-6-defiziente Mäuse weisen einen Defekt in der Generierung von T_H17-Zellen auf. Die vorherrschende Zellpopulation in diesen Mäusen sind Foxp3⁺ Tregs [23]. Diese Verteilung trägt dazu bei, dass IL-6 *knockout* Mäuse gegenüber der Induktion einer EAE sowie einer Antigen-induzierten Arthritis (AIA) resistent sind [27-31]. IL-6 besitzt damit eine entscheidende Rolle, ob die Immunantwort vorwiegend von Tregs oder T_H17-Zellen dominiert wird.

Obwohl TGF- β und IL-6 die Transkription von IL-17 synergistisch induzieren, werden noch weitere T_H17-spezifischen Gene durch TGF- β und IL-6 reguliert. So wird z.B. TGF- β auch für die Induktion des IL-23-Rezeptors (IL-23R) benötigt [24]. Hohe Konzentrationen an TGF- β jedoch unterdrücken die IL-23R-Expression und begünstigen die Foxp3-Expression [32]. Auch IL-6 und IL-21, ein weiteres T_H17-spezifisches Zytokin, führen zur Expression des IL-23R auf CD4⁺ T-Zellen [33, 34].

IL-23 gehört in die IL-12-Zytokinfamilie und wurde als erstes im Jahr 2000 von Oppmann *et al.* beschrieben [35]. Als Heterodimer besteht IL-23 aus den Untereinheiten p19 und p40. Die Untereinheit p40 wiederum bildet in Kombination mit p35 das Zytokin IL-12. IL-23 ist nicht in die initiale Differenzierung von T_H17-Zellen involviert, trägt allerdings entscheidend zur vollständigen und stabilisierten T_H17-Antwort bei. IL-23 wurde bereits 2003 als regulatorisches Zytokin der T_H17-Zellen beschrieben [36]. IL-23p19-defiziente Mäuse sind gegenüber der Induktion einer EAE sowie einer Collagen-induzierten Arthritis (CIA) resistent. Dieser Effekt wurde mit einem Defekt der IL-17-Expression, aber intakten IFN- γ -Expression begründet [34, 36]. Langrish *et al.* konnten zeigen, dass T_H17-Zellen, isoliert aus IL-23-defizienten Mäusen, durch die Zugabe von IL-23 expandieren. Sie lieferten damit den direkten Beweis, dass IL-23 für die Initiation der T_H17-Differenzierung *in vivo* nicht benötigt wird. Der Grund dafür liegt in der fehlenden Expression des IL-23R auf naiven T-Zellen. Es ist anzunehmen, dass die Expression des IL-23R für die

endgültige Differenzierung der T_H17-Zellen entscheidend ist und IL-23 das Überleben sowie die Proliferation dieser T-Zellpopulation nach der Primärantwort vermittelt.

IL-21, beschrieben im Jahr 2000 von Parrish-Novak *et al.*, zählt zur IL-2-Zytokinfamilie und wird vorwiegend von aktivierten T-Zellen und Natürlichen Killer-T-Zellen (NKT-Zellen) produziert [37]. In Kombination mit TGF- β induziert IL-21 über die Aktivierung von STAT3 einen alternativen Weg der Generierung von T_H17-Zellen [38, 39]. Somit hat IL-21, das von differenzierten T_H17-Zellen produziert wird, die Funktion eines positiven *feedback loops* und ist in der Lage die Frequenz an T_H17-Zellen zu amplifizieren [40]. Dieser intrinsische Autoamplifikationsloop wurde bereits für T_H1- und T_H2-Zellen beschrieben, in denen die Effektorzytokine IFN- γ und IL-4 als Amplifikationsfaktoren für T_H1- und T_H2-Zellen entsprechend wirken. Obwohl IL-21 durch IL-6 induziert wird, erfolgt die Generierung von T_H17-Zellen durch TGF- β und IL-6 unabhängig von IL-21 [33, 40].

Neben den bereits genannten Zytokinen führen der *tumor necrosis factor- α* (**TNF- α**) und **IL-1 β** zu einer erhöhten T_H17-Differenzierung nach Stimulation mit TGF- β und IL-6 [22]. IL-1 β wird von aktivierten myeloiden Zellen exprimiert und bindet an den IL-1R. Vergleichbar zum IL-23R wird der IL-1R auf T_H17-Zellen verstärkt exprimiert. Sutton *et al.* konnten beweisen, dass die Induktion Antigen-spezifischer T_H17-Zellen, jedoch nicht T_H1 oder T_H2-Zellen, in IL-1R-defizienten Mäusen aufgehoben ist. Demzufolge ist die EAE Inzidenz in diesen Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp (WT) Tieren niedriger [41]. Diese Ergebnisse zeigen, dass der IL-1-Signalweg für die T_H17-Differenzierung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* wichtig ist. Außerdem reguliert IL-1 die Expression der T_H17-spezifischen Transkriptionsfaktoren *interferon regulatory factor 4* (IRF4) und *retinoic acid-related orphan receptor γ* (ROR γ t) [42].

TNF- α , ein Vertreter der TNF/TNFR-Superfamilie, wird vorwiegend von Makrophagen produziert und ist sowohl an lokalen als auch systemischen Entzündungen beteiligt. IL-17A und TNF- α wirken synergistisch auf die Produktion von CXCL-Chemokinen [43, 44].

Neben Faktoren, die die Differenzierung muriner T_H17-Zellen fördern, existieren Zytokine die diese wiederum inhibieren können. Publikationen über die Differenzierung von T_H17-Zellen zeigen, dass IFN- γ die IL-17-Produktion supprimiert [10, 11]. Damit werden die T_H17-Zellen als distinkte Zellpopulation dargestellt. Die inhibitorischen Effekte von IFN- γ , aber auch von IL-4 werden von den Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT6 vermittelt. IFN- α als Typ 1 IFN inhibiert die T_H17-Differenzierung vergleichbar zu IFN- γ über STAT1 [11].

IL-27 - ein weiteres Zytokin der IL-12-Zytokinfamilie - ist ein Heterodimer bestehend aus den Untereinheiten p28 und *Epstein-Barr virus-induced gene 3* (EBI3) [45]. IL-27 wird von APCs produziert und induziert die Polarisierung von naiven T-Zellen in Richtung T_H1-Zellen [46]. Die Bindung von IL-27 an dessen Rezeptor (IL-27R α bzw. WSX1 und Glykoprotein130 (gp130)) [47] führt zur Phosphorylierung von STAT1 und inhibiert somit die T_H17-Antwort, vergleichbar zu IFN- γ und IFN- α [48, 49]. Demzufolge entwickeln IL-27R α -defiziente Mäuse eine schwere Entzündung des Zentralnervensystems (ZNS) nach Induktion einer EAE und weisen eine erhöhte Frequenz an T_H17-Zellen im ZNS auf.

2007 wurde gezeigt, dass **IL-35**, ein Heterodimer bestehend aus EBI3 und IL-12p35, die IL-10-Produktion in Foxp3⁺ Tregs induziert und die T_H17-Differenzierung unterdrückt [50]. IL-35 selbst wird von murinen Foxp3⁺ Treg Zellen exprimiert [51].

Auch **IL-2**, ursprünglich bekannt als T-Zellwachstumsfaktor, kann über den Transkriptionsfaktor STAT5 die Differenzierung von T_H17-Zellen inhibieren [52]. Im Gegensatz dazu ist dem Zytokin IL-2 eine

entscheidende Rolle in der Generierung und dem Überleben von Tregs zu zuordnen [53-55]. Demzufolge konnten in IL-2-defizienten Mäusen ein erhöhter Anteil an T_H17-Zellen nachgewiesen werden, während die Anzahl der peripheren Tregs reduziert ist.

1.2.2. Transkriptionelles regulatorisches Netzwerk der T_H17-Zellen

Die Differenzierung von T_H-Zellen wird über diverse Signale, ausgehend vom TZR, aber auch von Zytokinrezeptoren, vermittelt. Diese Signale wiederum aktivieren und induzieren Transkriptionsfaktoren, die für die Expression T-Zell-spezifischer Gene für Zytokine und Zytokinrezeptoren verantwortlich sind.

Das transkriptionelle regulatorische Netzwerk ist in Abb.2 schematisch dargestellt. Der spezifische Transkriptionsfaktor für T_H17-Zellen ist **ROR γ t** (*retinoic acid-related orphan receptor*) – eine Spleißvariante von ROR γ . ROR γ t gehört zusammen mit ROR α und ROR β in die Familie der *orphan nuclear hormone receptors* [56]. Der Transkriptionsfaktor ROR γ t wird für die Entwicklung der *lymphoid tissue inducer* (LTi) und LTi-ähnlichen Zellen benötigt. LTi Zellen wiederum regulieren die Entwicklung des lymphoiden Gewebes im Fetus sowie im adulten Intestinum [57-59]. Eberl *et al.* zeigten 2004, dass ROR γ t auch in doppelpositiven CD4⁺CD8⁺ Thymozyten exprimiert wird [60]. Zwei Jahre später konnte von Ivanov *et al.* die Expression von ROR γ t in intestinalen *Lamina propria* T-Lymphozyten nachgewiesen werden [61]. Diese Zellen sind charakterisiert durch die konstitutive Produktion von IL-17. IL-6 und TGF- β induzieren die Aktivierung von ROR γ t. Obwohl im IL-17-Promotor eine potentielle ROR-Bindestelle identifiziert werden konnte, ist bis heute nicht eindeutig bewiesen, ob ROR γ t direkt an den Promotor binden kann. Hingegen konnte gezeigt werden, dass STAT3 an der Induktion von ROR γ t beteiligt ist und direkt an den IL-17- und den IL-21-Promotor bindet [39, 62].

Ein weiteres Mitglied der ROR Familie, **ROR α** , wird ebenfalls selektiv in T_H17-Zellen exprimiert. Eine ROR α -Defizienz reduziert die IL-17-Produktion *in vitro* und *in vivo*, während die Abwesenheit beider Transkriptionsfaktoren, ROR α und ROR γ t, die T_H17 Differenzierung komplett inhibiert [63]. Demzufolge ist davon auszugehen, dass mehrere Transkriptionsfaktoren in die T_H17-Differenzierung involviert sind. Diese Vermutung würde auch die minimale IL-17-Produktion in ROR γ t-defizienten Mäusen erklären [61].

Für die Hochregulation von ROR γ t sind zusätzlich weitere Transkriptionsfaktoren – wie STAT3 und IRF4 – von großer Bedeutung.

Mehrere Publikationen zeigen, dass **STAT3** eine wichtige Komponente der IL-6-vermittelten Regulation von T_H17-Zellen ist [33, 34]. Yang *et al.* konnten belegen, dass die STAT3-Defizienz speziell in CD4⁺ T-Zellen die Induktion von ROR γ t und ROR α und somit auch die Induktion von T_H17-Zellen reduziert [34]. Zusätzlich führt das Fehlen von STAT3 zu einem Defekt in der Expression von IL-17F, IL-22 und dem IL-23R. Darüber hinaus wurde auch die Notwendigkeit von STAT3 für die IL-21-Expression sowie die IL-21-vermittelte T_H17-Differenzierung bewiesen [40]. Die *in vivo* Relevanz von STAT3 für die T_H17-Differenzierung wurde von Harris *et al.* demonstriert: Eine STAT3-Defizienz in T-Zellen verhindert die Induktion der EAE [64].

Interferon regulatory factors (IRFs) sind eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die ein spezifisches DNA-Motiv, ein sogenanntes *Interferon-stimulated response element* (ISRE), erkennen [65]. IRF4 wird ausschließlich in Lymphozyten, Makrophagen und DCs exprimiert. Die Expression von IRF4 in Lymphozyten wird hervorgerufen durch die Stimulation des TZR und spielt eine wichtige Rolle bei der

Differenzierung naiver $CD4^+$ T-Zellen in T_H2 - oder T_H17 -Zellen [66-68]. Brüstle *et al.* konnten zeigen, dass IRF4-defiziente Mäuse keine EAE entwickeln und die T_H17 -Differenzierung in diesen Tieren blockiert ist. IRF4 reguliert die Expression von IL-21 und IL-23R und wird wiederum gehemmt durch das IRF4-Bindeprotein (IBP) [69, 70]. Der Nachweis, dass die Induktion der Transkriptionsfaktoren ROR γ t und ROR α in IRF4-defizienten Mäusen beeinträchtigt ist, lässt darauf schließen, dass IRF4 innerhalb der Signalkaskade früher aktiviert wird als ROR γ t und ROR α .

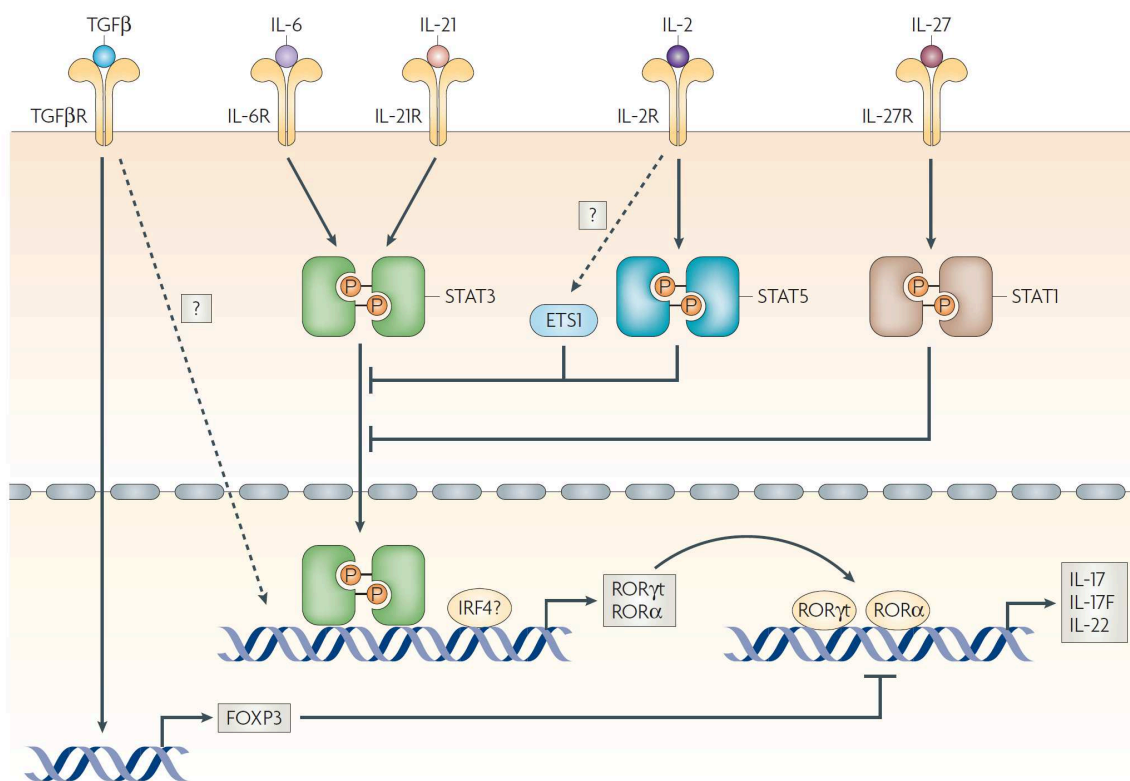


Abb. 2. Das transkriptionelle regulatorische Netzwerk der T_H17 -Differenzierung (Dong, 2008). Das inflammatorische Zytokin IL-6 induziert gemeinsam mit TGF- β eine STAT3-vermittelte Aktivierung von ROR γ t. Alternativ kann auch die Kombination aus TGF- β und IL-21 die Aktivierung von ROR γ t auslösen. TGF- β allein hingegen bewirkt die Aktivierung von Foxp3, inhibiert dadurch ROR γ t (sowie ROR α) und führt zur Differenzierung von Tregs. Die T_H17 -Differenzierung wird inhibiert durch STAT5 und STAT1, ausgelöst durch die Bindung von IL-2 an den IL-2R bzw. IL-27 an den IL-27R. Die TZR-abhängige Expression von IRF-4 führt zur Induktion von ROR γ t, inhibiert Foxp3 und fördert somit auch die T_H17 -Differenzierung. *Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd.*

Neben aktivierenden Transkriptionsfaktoren sind in die Regulation der T_H17 -Differenzierung auch inhibierende Transkriptionsfaktoren involviert. Transkriptionsfaktoren, die die Differenzierung weiterer T-Zelllinien regulieren, wie z.B. T-bet, GATA-3 und Foxp3, sind in der Lage die T_H17 -Generierung zu blockieren.

2007 wurde von Moisan *et al.* ein inhibitorischer Transkriptionsfaktor der T_H17 -Differenzierung identifiziert: **ETS-1** [71]. Bereits 2005 konnte bewiesen werden, dass ETS-1-defiziente T_H1 -Zellen eine extrem niedrige Produktion an IFN- γ , IL-2 und TNF- α sowie eine erhöhte Produktion an IL-10 aufweisen [72]. Später wurde durch die Differenzierung von naiven ETS-1-defizienten T-Zellen durch die Stimulation

mit TGF- β und IL-6 eine erhöhte Frequenz an IL-17 erreicht. Darüber hinaus produzierten diese Zellen wenig IL-2, was auf einen Defekt der STAT5-Phosphorylierung zurück zu führen ist. Die Resistenz gegenüber IL-2 führt jedoch nicht zu einer erhöhten Expression an ROR γ t in ETS-1-defizienten T_H17-Zellen. Die ETS-1-defiziente Mäuse sind gekennzeichnet durch eine erhöhte Expression an IL-17 in der Lunge sowie durch eine Mukusüberproduktion der Epithelzellen in den Atemwegen.

Auch der Treg-spezifische Transkriptionsfaktor **Foxp3** kann durch die Interaktion mit ROR γ t die IL-17-Expression inhibieren. Das wiederum erklärt die wichtige Funktion der Tregs in Inflammation und Autoimmunität [32, 73].

1.3. Effektorzytokine der T_H17-Zellen

Zu den charakteristischen Effektorzytokinen der differenzierten T_H17-Zellen zählen IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 und TNF- α (Abb.1 und Abb.2).

Die kodierende cDNA für **IL-17** wurde auf der Suche nach induzierten CTL-assoziierten (*cytotoxic T lymphocytes* CTL) Transkripten aus einer cDNA Bibliothek muriner Hybridomzellen zytotoxischer T-Lymphozyten isoliert. Aus diesem Grund wurde IL-17 zunächst als *cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 8* (CTLA-8) bezeichnet [74]. Erst später wurde das homologe Protein in Säugetieren als IL-17A bezeichnet. IL-17A wurde als erstes Mitglied der IL-17-Zytokinfamilie entdeckt. Weitere homologe Zytokine wurden anhand von Datenbankrecherchen und degenerativen Polymerase-Kettenreaktionen (PCR, engl. *polymerase chain reaction*)-Strategien detektiert und erhielten die Nomenklatur IL-17B bis IL-17F. Die IL-17-Zytokinfamilie besteht somit aus sechs verschiedenen Mitgliedern, wobei drei davon – IL-17A, IL-17F und IL-17E - als charakteristische T-Zellzytokine beschrieben sind und proinflammatorische Eigenschaften besitzen [75, 76]. IL-17F besitzt die größte Homologie zu IL-17A. Beide Proteine verfügen über eine 50%ig identische Aminosäuresequenz.

Die Sekretion von IL-17F wurde von T_H17-Zellen nach IL-23-Stimulation beschrieben [77]. Beide – IL-17A und IL-17F – sind als Homodimer aktiv. Darüber hinaus konnten auch IL-17A/IL-17F-Heterodimere identifiziert werden [78, 79]. IL-17 besitzt eine Vielzahl von Funktionen *in vivo*, inklusive der Regulation der Granulopoese in Stresssituationen [80, 81] sowie der Expression von CXC-Chemokinen in Fibroblasten, vaskulärem Endothel und Epithelzellen der Atemwege. Die CXC-Chemokine wiederum lösen die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten aus [82, 83]. Während IL-17F-Homodimere G-CSF und CXCL1 nur schwach induzieren können, besitzen die IL-17A/IL-17F-Heterodimere eine vergleichbare Aktivität wie IL-17A-Homodimere. Der Fokus dieser Doktorarbeit liegt auf IL-17A, wobei im weiteren Verlauf IL-17A als IL-17 bezeichnet wird.

2002 wurden IL-17A ko Mäuse generiert [84]. Diese sind fertil und besitzen unter spezifisch pathogen-freien Haltungsbedingungen keine phänotypischen Auffälligkeiten. Auch in den Zellpopulationen des Thymus, der Lymphknoten und der Milz konnten in diesen Mäusen im Vergleich zu IL-17A^{+/+} Mäusen keine Veränderungen festgestellt werden. Jedoch sind IL-17A ko aber auch IL-17RA ko und IL-17RC ko Mäuse anfälliger gegenüber Infektionen mit *Candida albicans* [85-87]. IL-17A ist ein wichtiges Zytokin in der systemischen Immunantwort gegen *C.albicans* [88] und *Staphylococcus aureus* [89]. Puel *et al.* lieferten Beweise, dass humanes IL-17A und IL-17F für die protektive Immunantwort gegen *C.albicans* sowie gegen *S.aureus* notwendig sind [90]. Angeborene Defizite in der IL-17-Immunität beeinträchtigen die mukokutane Immunantwort gegen *C.albicans* [91, 92]. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass

Patienten mit einem angeborenen Defekt in der IL-17-Immunantwort auch für andere Infektionen prädisponiert sind.

Tab. 1. Expression und bekannte Funktionen der Mitglieder der IL-17 Zytokinfamilie. Die IL-17-Zytokinfamilie besteht aus sechs Mitgliedern, deren Rezeptoren z.T. bekannt sind. Die Expression der entsprechenden Mitglieder erfolgt von diversen Zellen und bestimmt somit auch dessen Funktion. Gaffen SL, Nature review, 2009 [93].

	Alternative Bezeichnung	Rezeptor	Funktion	Expression
IL-17A	IL-17 CTLA-8	IL-17RA IL-17RC	Autoimmunpathologie, Rekrutierung Neutrophiler, Immunität gegen extrazelluläre Pathogene	T _H 17-Zellen, CD8 ⁺ T-Zellen, γδ T-Zellen, NK Zellen, NKT-Zellen, LTi Zellen
IL-17B	-	IL-17RB	Pro-inflammatorische Aktivität?	Zellen des Gastrointestinaltraktes, Pankreas und Neuronen
IL-17C	-	IL-17RE	Pro-inflammatorische Aktivität?	Zellen der Prostata und fetalen Niere
IL-17D	-	unbekannt	Pro-inflammatorische Aktivität?	Zellen der Muskeln, Gehirn, Herz, Lunge, Pankreas und Fettgewebe
IL-17E	IL-25	IL-17RA IL-17RB	Induziert T _H 2-Antwort und inhibiert die T _H 17-Antwort	Intraepitheliale Lymphozyten, Lungenepithelzellen, Alveolarmakrophagen, Eosinophile, Basophile, NKT-Zellen, T _H 2-Zellen, Mastzellen, Zellen des Gastrointestinaltraktes und des Uterus
IL-17F	-	IL-17RA IL-17RC	Rekrutierung Neutrophiler, Immunität gegen extrazelluläre Pathogene	T _H 17-Zellen, CD8 ⁺ T-Zellen, γδ T-Zellen, NK Zellen, NKT-Zellen, LTi Zellen
IL-17A/IL-17F-Heterodimer	-	-	Autoimmunpathologie, Rekrutierung Neutrophiler, Immunität gegen extrazelluläre Pathogene	T _H 17-Zellen, CD8 ⁺ T-Zellen, γδ T-Zellen, NK Zellen, NKT-Zellen, LTi Zellen

CTLA-8: *cytotoxic T lymphocyte antigen*, IL-17R: IL-17-Rezeptor, LTi: *lymphoid tissue inducer*, NKT: Natürliche Killer T-Zellen, T_H: T-Helfer

Neben IL-17A und IL-17F ist **IL-22** ein weiteres charakteristisches Effektorzytokin der T_H17-Zellen. IL-22 wurde ursprünglich bezeichnet als *IL10-related T cell-derived inducible factor* und bindet an den IL-22R, der aus IL-22Rα und IL-10R2 besteht [94, 95]. Die Expression des IL-22-Rezeptors beschränkt sich auf Zellen des nicht-hämatopoetischen Systems in der Haut, Niere, Leber, Lunge und Darm und regelt somit die epitheliale, endotheliale und stromale Zellantwort auf Infektionen [96]. Ursprünglich wurde IL-22 mit T_H1-Zellen assoziiert. Im Jahr 2006 konnte jedoch gezeigt werden, dass IL-22 von T_H17-Zellen produziert wird [97]. *In vitro* differenzierte T_H17-Zellen zeigen sowohl IL-17- bzw. IL-22-Singleproduzenten als auch IL-17/IL-22-Doppelproduzenten. Die gleichen Beobachtungen konnten auch *in vivo* gemacht werden.

Vergleichbar zur IL-17-Expression ist auch die IL-22-Expression nicht ausschließlich auf T_H17-Zellen beschränkt. $\gamma\delta$ T-Zellen, NKT-Zellen und NK-Zellen exprimieren IL-22 nach Aktivierung bzw. Stimulation [98]. Auch LT α Zellen produzieren IL-22, dessen Expression nach IL-23-Stimulation induziert wird [99, 100]. IL-22 als multifunktionelles Zytokin induziert die Expression antimikrobieller Peptide wie β -Defensin 2 und β -Defensin 3 über STAT3 [96] sowie die Expression Gewebe-inflammatorischer als auch Gewebe-protektiver Gene. In experimentellen Modellen der Psoriasis und der Rheumatoiden Arthritis als auch infolge einer *Toxoplasma gondii* Infektion zeigt IL-22 eine proinflammatorische Wirkung [101-104]. Nach Infektion mit Gram-negativen Bakterien ist die Funktion von IL-22 in der Aufrechterhaltung der Epithelbarriere begründet und besitzt somit in Synergie mit dem koexprimierten Zytokin IL-17A eine protektive Wirkung gegenüber bakteriellen Infektionen [97, 105, 106]. Neben den antimikrobiellen Eigenschaften zeigen verschiedene Studien auch Gewebe-protektive Fähigkeiten von IL-22 in Mausmodellen der Inflammatorischen Enteritis (IBD, engl. *inflammatory bowel disease*) und der Hepatitis [107-111]. Im Mausmodell der Bleomycin-induzierten akuten Entzündung der Atemwege besitzt IL-22 eine pathologische Funktion. Dabei reguliert IL-17A die proinflammatorischen und Gewebe-protektiven Eigenschaften von IL-22 in der Lunge [112]. Im Gegensatz dazu schützt die IL-22-Defizienz Mäuse nicht vor der Induktion einer EAE [113].

IL-21 wird ebenfalls von T_H17-Zellen aber auch von NKT-Zellen produziert [39, 114]. Induziert wird dessen Expression durch IL-6 und STAT3. Darüber hinaus ist IL-21 in der Lage dessen eigene Expression zu regulieren [33, 38, 40]. Der funktionelle Rezeptorkomplex für IL-21 besteht aus der Zytokinrezeptor γ Kette (γ_c , engl. *common γ chain*), die gleicherweise eine Untereinheit des IL-2-, IL-4- und des IL-5 Rezeptorkomplexes ist, [37] und dem IL-21R [115, 116]. Der IL-21R wird auf T-Zellen, B-Zellen, NK Zellen, DCs, Makrophagen und Epithelzellen exprimiert [37, 117-121]. IL-21 als pleiotropes Zytokin begünstigt sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunität. In Bezug auf T_H17-Zellen ist IL-21 *in vivo* nicht zwingend erforderlich, da in Abwesenheit von IL-21 oder auch dem IL-21-Rezeptor eine normale Entwicklung von T_H17-Zellen zu beobachten ist [122-124].

Neben den aufgeführten Effektorzytokinen sind T_H17-Zellen in Maus und Mensch auch charakterisiert über die Expression von CCL20 (auch bekannt als MIP3 α), dem Liganden des CC-Chemokin-Rezeptors 6 (CCR6) [125, 126]. Die synchrone Expression von IL-17 und CCR6 in $\alpha\beta$ als auch $\gamma\delta$ T-Zellen [126, 127] lässt darauf schließen, dass die IL-17-produzierenden T-Zellen ihre Rekrutierung in das inflammatorische Gewebe über einen parakrinen Mechanismus regulieren können. Die Hochregulation von CCR6 als auch von CCL20 wurde bereits unter verschiedenen inflammatorischen Bedingungen, z.B. während der EAE, beschrieben [128, 129]. In Bezug auf die Suszeptibilität der CCR6-defizienten Mäusen existieren jedoch widersprüchliche Daten. In zwei unterschiedlichen Studien entwickeln diese Mäuse einen wesentlich milderen EAE-Krankheitsverlauf im Vergleich zu den Kontrollen [129, 130], während drei andere Gruppen eine schwerere Form der EAE in den CCR6-defizienten Mäusen beschreiben [131-133].

1.4. IL-17 als Effektorzytokin weiterer Zelltypen

T_H17-Zellen sind die am besten charakterisierten IL-17-produzierenden Zellen der adaptiven Immunantwort. Darüber hinaus sind auch weitere Zellen in der Lage IL-17 zu produzieren, z.B. CD8⁺ T-

Zellen in der Maus [134, 135] und im Menschen [136], sowie invariante natürliche Killer-T-Zellen (iNKT-Zellen) [137].

Unter Berücksichtigung der Wirkung von IL-17 auf das angeborene Immunsystem, sind auch Zellen – wie z.B. $\gamma\delta$ T-Zellen, NK-Zellen, Mastzellen, Alveolarmakrophagen und Neutrophile - wichtige IL-17-Produzenten [138-144]. Im Review von Cua und Tato [145] werden diese Zellen als „Wächter des Immunsystems“ bezeichnet. Diese Zellen erkennen keine prozessierten Antigene und durchlaufen keine Entwicklungs- und Expansionsprogramme. Zu finden sind sie in speziellen Geweben, die den Wirt vor der Umwelt abgrenzen – so z.B. im Darm, in der Lunge und in der Haut.

$\gamma\delta$ T-Zellen sind vorwiegend in der Mukosa lokalisiert und können anhand der Expression von CD27, einem Mitglied der TNF-Familie, in zwei Kategorien unterteilt werden, die entweder IL-17 oder IFN- γ produzieren. CD27⁻ $\gamma\delta$ T-Zellen exprimieren konstitutiv ROR γ t und sind nach Restimulation mit PMA und Ionomycin in der Lage IL-17 zu produzieren [146]. CD27⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen hingegen exprimieren T-bet und produzieren IFN- γ . Der Ligand für CD27, CD70, wird konstitutiv auf dem Thymusepithel exprimiert, sodass diese $\gamma\delta$ T-Zellen im Thymus bereits voraktiviert werden und IFN- γ exprimieren [147]. 2009 konnte auf IL-17-produzierende $\gamma\delta$ T-Zellen CCR6 nachgewiesen werden, dessen Expression charakteristisch für T_H17-Zellen ist [148].

Auch **NK-Zellen** der Mukosa exprimieren ROR γ t und besitzen die Fähigkeit IL-17 zu produzieren. In NK-Zellen aus *Toxoplasma gondii*-infizierten Mäusen erfolgt die IL-17-Expression in Abhängigkeit von IL-6 und IL-23 [149].

Darüber hinaus gibt es grundlegende Beweise für die Existenz IL-17-positiver, **myeloider Zellen**. In einem murinen Modell der akuten Nierenschädigung (IRI, engl. *ischemia-reperfusion injury*) werden sowohl IFN- γ als auch IL-17 von neutrophilen Granulozyten exprimiert. Dies wiederum begünstigt die Einwanderung Neutrophiler in das geschädigte Nierengewebe [150].

Obwohl der größte Anteil der Zellen des angeborenen Immunsystems in Epithelien zu finden sind, können diese Zellen im Verlauf Gewebe-spezifischen Entzündungen aus sekundär lymphatischen Organen in immunprivilegierte Regionen wie dem Zentralen Nervensystem migrieren und dort den Krankheitsprozess beeinflussen [151].

1.5. Die Funktion von IL-17

Die Funktion des Zytokins IL-17 besteht in der Koordination lokaler Entzündungsprozesse durch die Hochregulation proinflammatorischer und Neutrophil-mobilisierender Zytokine und Chemokine.

IL-17 ist in der Lage die Produktion von Zytokinen (z.B. IL-6, G-CSF, TNF- α und IL-1 β), von CXC-Chemokinen (z.B. CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL8 und CCL20) sowie von weiteren inflammatorischen Effektoren (iNOS, anti-mikrobielle Gene) in einer Vielzahl von Zellen, u.a. in Fibroblasten und Epithelzellen, zu induzieren [152, 153]. Damit trägt IL-17 zur Rekrutierung myeloider Zellen – wie z.B. von Monozyten und von Neutrophilen – in das entzündete Gewebe bei und fördert so die Gewebeinflammation als auch dessen Schädigung [83].

1.5.1. Die Rolle von IL-17 in Autoimmunerkrankungen

IL-17 als Effektorzytokin konnte in verschiedenen chronischen Erkrankungen identifiziert werden. So wurde z.B. IL-17 eine wichtige Funktion in der Rheumatoiden Arthritis (RA) sowie in den entsprechenden Tiermodellen nachgewiesen [154-157].

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine der ersten humanen Erkrankung, die mit IL-17 assoziiert wurde. Es konnte gezeigt werden, dass IL-17 in humanen Synovialzellen die Produktion von IL-6, IL-8 und TNF induziert. Darüber hinaus wurde vermutet, dass IL-17 direkt auf die Stromazellen wirkt und Entzündungen fördert [153, 158]. Im humanen arthritischen Synovium sind T_H17 -Zellen in der Lage *receptor activator of nuclear factor κ B ligand* (RANKL) zu exprimieren, der wiederum die Entwicklung Knochen-resorptiver Osteoklasten fördert [159]. In einem Mausmodell der RA – der Collagen-induzierten Arthritis (CIA) – führt die Applikation des IL-17-Antikörpers zu einer reduzierten Schädigung der Gelenke sowie zu einer histologischen Zerstörung von Knorpel und Knochen und zu einer reduzierten IL-6-Konzentration im Serum [160]. Ferner sind IL-17-defiziente Mäuse resistent gegenüber der CIA [161]. Demzufolge ist anzunehmen, dass IL-17 an der Erosion von Knorpel und Knochen in Gelenkserkrankungen beteiligt ist. Eine Assoziation zwischen IL-17 und Transplantatabstoßung [162], Pankreatitis [163], Inflammatorischer Enteritis [164], Systemischer Sklerose [165] oder Multipler Sklerose (MS) [166] wurden bereits beschrieben.

Auch in der EAE – dem Mausmodell der MS – sind T_H17 -Zellen an der Pathogenese beteiligt. Die EAE ist eine T-Zellvermittelte autoimmune, inflammatorische Erkrankung des Zentralen Nervensystems und führt zu Paralysen. T_H1 -Zellen galten lange Zeit als entscheidende Faktoren für den Verlauf der EAE [167]. Die Analyse verschiedener Mäuse mit einem Defekt in der T_H1 -Entwicklung führte jedoch zu widersprüchlichen Resultaten. IL-12p35-, IL-12R β 2- (Defekt der IL-12 Rezeptor β 2-Kette) oder IFN- γ -defiziente Mäuse sind suszeptibel gegenüber einer EAE-Induktion, während IL-12p40-defiziente Mäuse demgegenüber resistent sind [168-170]. Die Identifizierung des Zytokins IL-23 [35], welches die gleiche Untereinheit IL-12p40 besitzt wie IL-12, führte zu einem besseren Verständnis der Pathogenese der EAE sowie der Autoimmunität im Allgemeinen. Somit konnte gezeigt werden, dass IL-23-defiziente Mäuse gegenüber einer EAE-Induktion komplett resistent sind und einen Defekt im T_H17 -Kompartiment besitzen [171]. Darüber hinaus sind IL-23-stimulierte Myelin-spezifische CD4⁺ T-Zellen stärker enzephalitogen als Zellen, die mit IL-12 stimuliert wurden [77]. Diese Daten zeigen, dass IL-23 und nicht IL-12 eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der EAE spielt. Trotzdem sind in den ZNS-Infiltraten EAE-erkrankter Mäuse sowohl T_H17 - als auch T_H1 -Zellen nachweisbar. Der relative Anteil der Populationen variiert in Abhängigkeit der Mausstämme und der Immunisierungsstrategie [77, 172].

Obwohl in Gehirnläsionen und in mononukleären Zelle aus Blut und Cerebrospinalflüssigkeit von MS-Patienten IL-17 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden konnte, existieren konträre Daten, ob T_H17 -Zytokine (IL-17A, IL-17F und IL-22) an der Entwicklung der Erkrankung beteiligt sind [113, 173]. In MS-Patienten fördert IL-17A den Entzündungsprozess und führt zur Zerstörung der sogenannten *tight junctions*, die Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke sind. Somit sind T_H17 -Zellen in der Lage in das ZNS zu migrieren und dort neuronale Schäden zu verursachen [174].

Neben T_H17 -Zellen konnten auch hohe Frequenzen an IL-17-produzierenden $\gamma\delta$ T-Zellen im ZNS von EAE-erkrankten Mäusen nachgewiesen werden [151]. Diese $\gamma\delta$ T-Zellen exprimieren den IL-23R sowie den Transkriptionsfaktor ROR γ t und sind charakterisiert über die Produktion von IL-17, IL-21 und IL-22.

Aktiviert werden diese Zellen durch die Stimulation mit IL-1 β und IL-23, ohne die Bindung des TZR. $\gamma\delta$ T-Zellen fördern die IL-17-Produktion durch CD4⁺ T-Zellen und erhöhen somit die Suszeptibilität gegenüber einer EAE.

1.5.2. Die Rolle von IL-17 in Infektionen

Während IL-17 bereits 1995 beschrieben wurde [12], konnte IL-17 erst im Jahr 2000 eine potentielle Funktion in Entzündungen, hervorgerufen durch Infektionen, nachgewiesen werden [175]. *Borellia burgdorferi* wurde als erstes Pathogen beschrieben, welches eine IL-17-Antwort in T_H-Zellen auslöst [9]. IL-17-produzierende Zellen spielen eine entscheidende Rolle in der mukosalen Immunantwort [176] und sind auf mukosalen Oberflächen angereichert. T_H17-Zellen exprimieren CCR6, welches für die Rekrutierung dieser Zellen in die Mukosa verantwortlich ist [133]. IL-17 moduliert die Neutrophilenantwort über Zytokine, die deren Expansion und Überleben fördern (G-CSF) als auch Neutrophil-Chemoattraktanten (CXCL1, CXCL2, CXCL5). Zusätzlich sind CXCL9, CXCL10 und CCL20 Zielgene von IL-17, die wiederum eine chemotaktische Aktivität auf Lymphozyten, DCs und weiteren Immunzellen besitzen. Auch antimikrobielle Peptide, die über das Abtöten eingedrungener Pathogene zur Wirtsabwehr beitragen, werden durch IL-17 hochreguliert. Diese antimikrobiellen Peptide wie β -Defensine, S-100-Proteine, Lipocaline und Lactoferrine werden von Epithelzellen, als auch von Neutrophilen und Makrophagen produziert, die den IL-17R exprimieren.

In Infektionen mit Gram-negativen Bakterien besitzt IL-17 durch die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten, der Hochregulation antimikrobieller Peptide und der Modulation der Makrophagenfunktion eine protektive Funktion. Dies betrifft intestinale Infektionen, hervorgerufen durch *Citrobacter rodentium* und *Salmonella enterica*, pulmonale Infektionen (*Klebsiella pneumoniae*, *Bordetella pertussis*, *Staphylococcus aureus*) aber auch peritoneale Infektionen (*Porphyromonas gingivalis*) [177]. Auch in Mykosen, hervorgerufen durch *Candida albicans*, *Pneumocystis carinii* und *Aspergillus fumigatus*, verfügt IL-17 über einen protektiven Mechanismus.

Im Falle der experimentellen pulmonalen Infektion mit *K.pneumoniae* zeigen IL-17RA ko Mäuse eine defekte G-CSF-Antwort und Granulopoese sowie eine erhöhte Suszeptibilität [178, 179]. Die verminderte Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die Atemwege erklärt wahrscheinlich die erhöhte Bakteriämie und Mortalität dieser Tiere. Vergleichbare Resultate konnten 2008 von Aujla *et al.* durch die Infektion von IL-17A ko Mäusen beobachtet werden [105]. Außerdem sind IL-17RA ko Mäuse suszeptibel für *Candida albicans* [180] und *Toxoplasma gondii* Infektionen [181]. Hingegen konnte gegenüber intrazellulären Pathogenen wie *Mycobacterium tuberculosis* oder *Listeria monocytogenes* keine erhöhte Suszeptibilität der IL-17RA ko Mäuse nachgewiesen werden [105]. Somit ist die Wirkung von IL-17 vielmehr gegen extrazelluläre als intrazelluläre Pathogene gerichtet. Dabei sind nicht primär und ausschließlich IL-17-produzierende CD4⁺ T-Zellen beteiligt. Im Falle der Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* oder *Mycobacterium bovis* BCG sind $\gamma\delta$ T-Zellen die initialen Produzenten von IL-17 [179, 182].

Die virale Wirtsantwort wird vorwiegend von Typ I IFN moduliert. Zunehmend existieren Beweise, die auch den Einfluss von IL-17 in die virale Immunantwort beschreiben, welche entweder vorteilhaft oder schädlich für den Wirt sein können. Hou *et al.* identifizieren die Funktion von IL-17 in einem persistierenden Virusmodell, hervorgerufen durch *Theiler's murine Encephalomyelitis Virus* (TMEV). Diese Virusinfektion führt in Mäusen zu einer demyelinisierenden Erkrankung [183]. Während der TMEV-

Infektion kommt es zur Differenzierung von T_H17 -Zellen und zur Migration dieser Zellpopulation in das ZNS. Im Falle einer Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) -induzierten Infektion in Mäusen ist IL-17 in der Kornea nachweisbar. Die Infektion von IL-17R-defizienten Mäusen mit HSV-1 führt zu einer verminderten Neutrophileninfiltration und zu einer geringeren Pathologie [184].

Somit wird in einigen viralen Infektionen die T_H17 -Differenzierung induziert, deren Zielgene zum größten Teil in Bezug auf die Wirtsabwehr ineffektiv sind und eher zur Immunpathologie beitragen.

1.6. Zielsetzung der Arbeit

Zu Beginn der experimentellen Arbeiten im Jahr 2006 waren T_H17 -Zellen als neu-definierte T-Zellpopulation beschrieben worden. Somit gab es viele Fragen in Bezug auf Entwicklung, Stabilität und Plastizität dieser Zellpopulation. Die Erkenntnisse darüber sind von großer Bedeutung, da T_H17 -Zellen sowohl in Autoimmunerkrankungen, z.B. in der EAE, als auch in Infektionen entscheidend beteiligt sind. Demnach kann die Aufklärung der Plastizität dieser T_H17 -Zellen zur Entwicklung neuer Therapien beitragen.

In dieser Arbeit sollte der Einfluss von T_H1 -, T_H2 - sowie T_H0 - (neutral, ohne Zugabe von Antikörpern oder Zytokinen) Bedingungen auf *in vitro* generierte sowie *ex vivo* isolierte T_H17 -Zellen untersucht werden. T_H17 -Zellen sollten *in vitro* generiert und dann unter definierten Bedingungen kultiviert werden, um die IL-17-Re-expression dieser Zellen zu untersuchen. Für die *ex vivo* Analysen wurden die IL-17-produzierenden $CD4^+$ T-Zellen aus zwei verschiedenen Autoimmunmodellen (EAE und G6PI-induzierte Arthritis) sortiert. Für die Isolation der IL-17-produzierenden $CD4^+$ T-Zellen wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Zellbiologie des Deutschen Rheumaforschungszentrums (DRFZ) in Berlin der von Miltenyi Biotec neuentwickelte IL-17 *Cytokine Secretion Assay* (CSA) eingesetzt. Dieser Assay ermöglicht die Sortierung vitaler, IL-17-produzierender $CD4^+$ T-Zellen aus einer Zellsuspension. Analog den *in vitro* generierten T_H17 -Zellen sollten die aus den Autoimmunmodellen isolierten T_H17 -Zellen unter definierten Bedingungen kultiviert und die IL-17-Re-expression analysiert werden.

In einem zweiten Abschnitt sollte das Zytokin IL-17 und dessen Funktion in einem murinen Influenzavirus Infektionsmodell (A/PR8/34 (H1N1)) untersucht werden. Erste Ergebnisse zeigten, dass IL-17 nach einer Influenzavirus Infektion in den Lungen der Mäuse produziert wird. Daraus ergaben sich folgende Fragen, die in diesem Abschnitt der Arbeit beantwortet werden sollten: Welche Zellen in den Lungen Influenzavirus-infizierter Mäuse exprimieren IL-17? Welche Auswirkungen hat die Blockade von IL-17 mit einem monoklonalen Antikörper auf den Verlauf der Influenzavirus Infektion?

2. MATERIAL

2.1. Biologisches Material

2.1.1. Mäuse

Folgende Mausstämme wurden verwendet:

DBA/1

C57BL/6

C57BL/6_IL-17 *knockout* (ko)

Alle Tierversuche wurden vom Thüringer Landesverwaltungsamt genehmigt (Reg.-Nr. 02-035/07; 02-052/08)

2.1.2. Viren/ Bakterien

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Maus-adaptierte Varianten des Influenza A Virus (Familie *Orthomyxoviridae*, Genus *Influenzavirus A*) verwendet:

Stamm A/PR8/34 (H1N1)

Stamm A/Hongkong/1/68 (H3N2)

Diese wurden freundlicherweise von Prof. Andreas Henke, Institut für Virologie und Antivirale Therapie, Jena zur Verfügung gestellt. Die Anzucht der Viren erfolgte mittels *Madin-Darby canine kidney* (MDCK) Zellen in Eagle Minimum Essential Medium (EMEM) mit 100 U/ml Penicillin (Lonza, Verviers, Belgium), 100 µg/ml Streptomycin Sulfat (Lonza), 2 mM L-Glutamin (Lonza) und 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren (Lonza) bei 37°C und 5 % CO₂. Aliquots der Virusstocklösung wurden bei –80°C bis zur Verwendung gelagert.

Für die sekundär bakterielle Infektion wurden die Mäuse mit den Bakterien der Gattung *Streptococcus pneumoniae* (Serotyp 3, Stamm NCTC7978) infiziert.

Die Infektion der Mäuse wurde in der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie an der Charité Berlin durchgeführt. Sowohl die Anzucht als auch die Infektion der Mäuse erfolgte durch Katrin Reppe.

2.2. Chemikalien, Kits und Verbrauchsmaterialien

2.2.1. Chemikalien

Allgemeine Laborchemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von SIGMA (Taufkirchen), ROTH (Karlsruhe), APPLICHEM (Darmstadt) bzw. SERVA (Heidelberg) bezogen. Gebrauchslösungen, welche je nach Bedarf angesetzt werden mussten, wurden mit komplett entsalztem Wasser aus einer „MilliQplus“ Filteranlage (MILLIPORE, Schwalbach) angesetzt und autoklaviert.

2.2.2. Kits

Isotypspezifischer ELISA ISO-2 von Sigma, Deisenhofen

Anti-FITC MultiSort Kit von MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach

Mouse IL-17 Secretion Assay von MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach

LIVE/DEAD® Fixable Dead Cell Stain Kit (L34955) von Invitrogen

RNeasy Mini Kit von Qiagen®, Hilden, Deutschland

Illumina® TotalPrep RNA Amplifikation Kit von Ambion, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

2.2.3. Verbrauchsmaterialien

AutoMACS® Separationssäulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Cluster-Tubes	Corning/Costar, Bodenheim
Combitips, Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Einmalpipetten in verschiedenen Größen	Greiner, Frickenhausen
Einmalspitzen	Brand, Wertheim
Einmalspritzen und –kanülen	Braun-Melsungen, Melsungen
FACS®-Röhrchen	BD Bioscience, Heidelberg
Falcons (15 ml/ 50 ml)	Greiner, Frickenhausen
EDTA Röhrchen	Sarstedt, Nürmbrecht
Handschuhe	Kimberly Clark
Heparinisierte Glas Einmalkapillarpipetten	Kabe Labortechnik, Eisenroth
MACS® Preseparations-Filter	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MaxiSorp-Platte	Nunc, Wiesbaden
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg.
Spitzen	Brand, Wertheim
Zellkulturflaschen und Platten	Greiner, Frickenhausen
Zellsieb (70 µm)	BD Bioscience, Heidelberg

2.3. Antikörper

2.3.1. Antikörper für Sortierung von Zellen mittels MACS® und ARIA

Für das Sortieren von Zellen wurden entweder Fluoreszenz-konjugierte Antikörper (Tab.2) oder MicroBeads-gekoppelte Antikörper (Tab.3) verwendet.

Tab. 2. Bezeichnung und Beschreibung der verwendeten anti-Maus Fluorochrom-konjugierten Antikörper für die Sortierung von Zellen mithilfe des AutoMACS® Separator und FACSAria™ mit der eingesetzten Verdünnung und deren Herkunft.

Spezifität	Klon	Isotyp	Konjugate	Quelle	Verwendung
CD4	GK 1.5	Ratte, IgG2b, κ	Dy495	Immunologie, Jena	FACSAria™
CD62L	MEL-14	Ratte, IgG2a κ	PE-Cy7	eBioscience	FACSAria™
IL-17	eBio17B7	Ratte, IgG2a κ	Biotin	eBioscience	FACSAria™
CD4	GK 1.5	Ratte, IgG2b, κ	FITC	MiltenyiBiotec	MACS®
CD8	YTS169	Ratte, IgG2b	Biotin	Immunologie, Jena	MACS®
B220 (CD45R)	RA3-6B2	Ratte, IgG2a κ	Biotin	Immunologie, Jena	MACS®

Tab. 3. Bezeichnung der verwendeten MicroBeads für die Sortierung von Zellen mithilfe des AutoMACS® Separator.

MicroBeads	Quelle	Verwendung
Anti-Biotin MicroBeads	MiltenyiBiotec	MACS®
Anti-CD62L MicroBeads	MiltenyiBiotec	MACS®

2.3.2. Antikörper für Färbung der Zellen im FACS

Die verwendeten anti-Maus Antikörper waren mit Fluorescein Isothiocyanat (FITC), R-Phycoerythrin (PE), Biotin (Bio), Indocarbocyanin (Cy), Alexa-Farbstoffen (A), Dyomics-Farbstoffen (Dy), Allophycocyanin (APC), Perdinin-Chlorophyll (PerCP) oder Tandem-Konjugaten dieser genannten Fluorochrome markiert. In Tab.4 (und auch in Tab.2) bezieht sich die Bezeichnung „Immunologie Jena“ auf Antikörper, welche am Institut für Immunologie in Jena aus Kulturüberständen von Hybridomen aufgereinigt und auch z.T. mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurden.

Tab. 4. Bezeichnung und Beschreibung der verwendeten Antikörper für Oberflächen- und intrazelluläre Färbung mittels FACS und deren Herkunft.

Spezifität	Klon	Isotyp	Konjugate	Quelle	Verwendung
CD3	145-2C11	Arm.Hamster IgG	PE	eBioscience	Oberflächenfärbung
CD4	RM4-5	Ratte, IgG2a, κ	APC- AlexaFluor750 APC eFlour780	eBioscience	Oberflächenfärbung
CD4	GK 1.5	Ratte, IgG2b, κ	Dy495	Immunologie, Jena	Oberflächenfärbung
CD8	53-6.7	Ratte, IgG2a, κ	PacBlue PerCP	Immunologie Jena BD Pharmingen	Oberflächenfärbung
CD11b	M1/70	Ratte, IgG2b, κ	PacBlue	eBioscience	Oberflächenfärbung
CD62L	MEL-14	Ratte, IgG2a κ	Dy647	Immunologie Jena	Oberflächenfärbung
γδTCR	eBioGL3 (GL-3, GL3)	Arm.Hamster IgG	PE-Cy5	eBioscience	Oberflächenfärbung
NK1.1	PK136	Maus, IgG2a	PE-Cy7	eBioscience	Oberflächenfärbung
GR-1	RB6-8C5	Ratte, IgG2b	APC	BD Pharmingen	Oberflächenfärbung
IL-17A	ebio 17B7	Ratte, IgG2a, κ	AlexaFluor488, AlexaFluor647 PE Biotin	eBioscience	Intrazelluläre Färbung
IFN-γ	XMG1.2	Ratte, IgG1, κ	PE PE-Cy7 PacBlue AlexaFluor488	eBioscience	Intrazelluläre Färbung
IL-4	11B11	Ratte, IgG1	PE APC	eBioscience	Intrazelluläre Färbung
CD154	MR1	Armenischer Hamster, IgG1, κ	APC	MiltenyiBiotec	Intrazelluläre Färbung
CD16/CD32		Ratte, IgG2b		DRFZ, Berlin	Blockierung unspezifischer Bindungen
SA-PE-Cy7				eBioscience	Sekundärantikörper

2.3.3. Antikörper für Immunhistochemie

Die Histologien sowie die immunhistochemischen Färbungen wurden in Kooperation mit Debrah Weih am Leibniz-Institut für Altersforschung in Jena (Arbeitsgruppe Prof. Falk Weih) durchgeführt. In Tab.5 sind die Antikörper aufgelistet, welche für die immunhistochemischen Färbungen verwendet wurden.

Tab. 5. Bezeichnung und Beschreibung der verwendeten Antikörper für die immunhistochemischen Färbungen sowie deren Herkunft.

Spezifität	Klon	Isotyp	Quelle
GR-1	RB6-8C5	Ratte, IgG2b	eBioscience
Neutrophil specific antibody	7/4	Ratte, IgG2a	AbD serotec

2.3.4. Antikörper für Isotypspezifischen *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

Für die Durchführung des isotypspezifischen ELISA's wurden die in Tab.6 aufgelisteten Antikörper verwendet, wobei die isotypspezifischen Antikörper Bestandteil eines Kits (ISO-2 von Sigma, Deisenhofen) sind.

Tab. 6. Bezeichnung und Beschreibung der verwendeten Antikörper für Isotyp ELISA mit der eingesetzten Verdünnung und deren Herkunft.

Spezifität	Beschreibung	Quelle	Verwendung und eingesetzte Verdünnung
Ziege anti-Maus IgM	M6157	Sigma	Primärantikörper (1:1000)
Ziege anti-Maus IgG1	M5532	Sigma	Primärantikörper (1:1000)
Ziege anti-Maus IgG2a	M5657	Sigma	Primärantikörper (1:1000)
Ziege anti-Maus IgG2b	M5782	Sigma	Primärantikörper (1:1000)
Ziege anti-Maus IgG3	M5907	Sigma	Primärantikörper (1:1000)
Esel anti-Ziege	K2706	Santa Cruz	Sekundärantikörper (1:3000)

2.3.5. Antikörper für Zellkultur

Sowohl für die Stimulation bzw. Restimulation von Zellen als auch für die Generierung von T-Zellsubpopulationen wurden spezielle Antikörper verwendet, die in der Tab.7 näher beschrieben sind.

Tab. 7. Bezeichnung und Beschreibung der verwendeten Antikörper für die Zellkultur mit der eingesetzten Konzentration und deren Herkunft.

Spezifität	Klon	Isotyp	Quelle	Verwendung und eingesetzte Konzentration
CD3	145-2C11	Hamster, IgG	Immunologie Jena	Simulation/Restimulation 2,5 µg/ml
CD28	37.51	Hamster, IgG	Immunologie Jena	Simulation/Restimulation 2,5 µg/ml
IL-4	11B11	Ratte, IgG1	Immunologie Jena	T-Zelldifferenzierung 10 µg/ml
IFN-γ	XMG1.2	Ratte, IgG1	Immunologie Jena	T-Zelldifferenzierung 10 µg/ml
IL-12	C15.6	Ratte, IgG1	Immunologie Jena	T-Zelldifferenzierung 10 µg/ml

2.3.6. Antikörper für *in vivo* Experimente

Tab. 8. Bezeichnung und Beschreibung der verwendeten Antikörper für *in vivo* Experimente mit deren Herkunft.

Spezifität	Klon	Isotyp	Herkunft
IL-17	MM17F3	Maus, IgG1	Catherine Uyttenhove, Belgium
IgG		Maus, IgG	Dianova, Hamburg

2.4. Peptide/ Proteine

Zur Immunisierung von Mäusen zur EAE-Induktion wurde folgendes Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (*myelin oligodendrocyte glycoprotein*, MOG)- Peptide verwendet:

MOG₃₅₋₅₅: M-E-V-G-W-Y-R-S-P-F-S-R-V-V-H-L-Y-R-N-G-K

Zur Antigen-spezifischen Restimulation von Zellen, isoliert aus Influenzavirus-infizierten Mäusen, wurden folgende Nukleoprotein (NP)-Peptide verwendet:

NP₂₆₁₋₂₇₅: R-S-A-L-I-L-R-G-S-V-A-H-K-S-C

NP₃₁₁₋₃₂₅: Q-V-Y-S-L-I-R-P-N-E-N-P-A-H-K

NP₃₆₆₋₃₇₄: A-S-N-E-N-M-E-T-M

Die MOG- und NP-Peptide wurden bei einer Konzentration von 4 mg/ml und bei –80°C bis zur Verwendung gelagert. Alle verwendeten Peptide wurden von Dr. R. Volkmer und C. Landgraf der AG Molekulare Bibliotheken, Institut für Medizinische Immunologie an der Charité Berlin, synthetisiert und bereitgestellt.

Glukose-6-phosphat-Isomerase (G6PI) zur Induktion der G6PI-induzierten Arthritis in DBA/1 Mäusen wird am Institut für Immunologie in Jena (Christine Beyer) über die Proteinexpression in *E.coli* hergestellt.

2.5. Zytokine

Tab. 9. Bezeichnung und Beschreibung der verwendeten Zytokine für die Kultivierung von T-Zellen sowie deren Herkunft und die eingesetzten Konzentrationen.

Zytokin	Herkunft	Verwendete Konzentration
IL-4	Peprotech, Hamburg	10 ng/ml
IL-6	Rose-John, Kiel	20 ng/ml
TGF-β	Peprotech, Hamburg	2 ng/ml
IL-12	ImmunoTools, Friesoythe	5 ng/ml
IL-23	R&D	20 ng/ml

2.6. Primer

Zur Typisierung der C57BL/6 IL-17 *knockout* Mäuse wurden folgende Primer verwendet:

Primer 1: 5'-ACT CTT CAT CCA CCT CAC ACG A-3' (*sense*)

Primer 2: 5'-GCC ATG ATA TAG ACG TTG TGG C-3' (*antisense*)

Primer 3: 5'-CAG CAT CAG AGA CTA GAA GGG A-3' (*antisense*)

Alle Primer wurden von der Firma BioTez Berlin-Buch GmbH synthetisiert.

Für den Nachweis der mRNA von Transkriptionsfaktoren mittels RT-PCR wurden folgende Primer verwendet:

Für HPRT	5'- GCT GGT GAA AAG GACCTC T-3' (<i>sense</i>) 5'- CAC AGG ACT AGA CCT GC -3' (<i>antisense</i>)
Für ROR γ t	5'-TGC AAG ACT CAT CGA CAA GG -3' (<i>sense</i>) 5'- AGGGGA TTC AAC ATC AGT GC -3' (<i>antisense</i>)
Für ROR α	5'- CCCCTA CTG TTC CTT CAC CA -3' (<i>sense</i>) 5'- AGC TGC CACATC ACC TCT CT -3' (<i>antisense</i>)
Für GATA-3	5'-CCT ACC GGG TTC GGA TGT AAG T-3' (<i>sense</i>) 5'-AGT TCG CGC AGG ATG TCC-3' (<i>antisense</i>)
Für T-bet	5'-TCC TGC AGTCTC TCC ACA AGT -3' (<i>sense</i>) 5'-CAG CTG AGT GAT CTCTGC GT -3' (<i>antisense</i>)

Für den Nachweis der Viruslast in der Lunge Influenzavirus-infizierter Mäuse wurden folgende Primer verwendet:

Für M2	5'-ACGAATGGGGGTGCAGATGCAAC-3' (<i>sense</i>) 5'-CGTAGAAGGCCCTCCTTTTCAGTCC-3' (<i>antisense</i>)
Für β -Aktin	5'-TGGGCG-ACGAGGCCAGAGCAAG-AAG-3' (<i>sense</i>) 5'-GCTCATTGTAGAAGGTGTG-GTGCCAG-3' (<i>antisense</i>)

2.7. Geräte

ARIA	BD Bioscience, Heidelberg
AutoMACS®Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Biofuge fresco	Hettich, Tuttlingen
Durchflussszytometer LSR II	BD Bioscience, Heidelberg
ELISA-Lesegerät	SLT Spectra Tecan, Crailsheim
ELISA-Washer	Tecan, Crailsheim
Feinwaage	Sartorius, Hannover
Heizblock Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Inkubatoren	Heraeus, Tuttlingen
Impfkäfig	FSU Jena
Kugelmühle Retsch® MM300	Qiagen
Magnetrührer SB 162-3 Stuart	BIBBY, Staffordshire UK
Megafuge 1.0R	Heraeus, Tuttlingen
Multipipette	Eppendorf, Hamburg
NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer	peqlab, Erlangen
Lichtmikroskop Axiovert25	Zeiss, Jena
Neubauer-Zählkammer	Fein-Optik, Bad Blankenburg
pH-Meter Knick	Portamess, Berlin
Photometer WPA biowave	Biochrom, Cambridge UK
Präparationsbesteck	Aeskulap, Tuttlingen
Schüttler	Heidolph, Kelheim
Sterilbank HERA safe	Heraeus, Tuttlingen
Tischzentrifuge minispin	Eppendorf, Hamburg
Ultrastab	Sonoplus, Bandelin
Vortexer Mixer Stuart	BIBBY, Staffordshire UK

3. METHODEN

3.1. Methoden der Proteinbiochemie

3.1.1. Isotyp-spezifischer *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)

Beschichtungspuffer, pH 9,6: 50 mM Na₂CO₃

PBS 1x: 136,9 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH₂PO₄; 7,9 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O

Blockpuffer: 2 % BSA/PBS (w/v)

Waschpuffer: 0,05 % Tween-20TM/PBS (v/v)

Phosphat-Citrat-Puffer, pH 5,0: 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphat; 0,05 M Zitronensäure

3N H₂SO₄

Kulturmedium: RPMI-1640 (PAA Laboratories), 10 % FCS (Sigma), 100 mM HEPES (Sigma), 20 U/ml Penicillin (PAA Laboratories), 0,1 mg/ml Streptomycin (PAA Laboratories), 50 µM 2-Mercaptoethanol (Roth)

Die Bestimmung Influenza-spezifischer Antikörper der Isotypen IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3 wurde mithilfe des *Mouse monoclonal antibody isotyping Kit Iso-2* von Sigma durchgeführt.

Die MaxiSorp-Platte (96 well) wurde mit UV-inaktiviertem Influenzavirus A/PR/8/34 (H1N1) beschichtet. Die Inkubation erfolgte ÜN in einer feuchten Kammer bei 4°C. Die Platte wurde dreimal mit Waschpuffer im ELISA-Washer gewaschen. Um unspezifische Bindungen auszuschließen erfolgte die Zugabe des Blockpuffers. Nach Inkubation mit Blockpuffer von 1 h bei RT wurde die ELISA-Platte erneut mit Waschpuffer gewaschen. Die Seren der Mäuse wurden in Zellkulturmedium (KM) entsprechend verdünnt und die Verdünnungsstufen anschließend in Dupletts aufgetragen. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer bei RT für 1 h. Nach wiederholtem Waschen mit Waschpuffer wurden die isotypspezifischen Ziege anti-Maus-Antikörper (IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3) 1:1000 in Waschpuffer verdünnt und aufgetragen. Nach einstündiger Inkubation bei RT und Waschen der ELISA-Platte erfolgte die Detektion mit einem Esel anti-Ziege Ig-POD Antikörper, der 1:3000 in Waschpuffer verdünnt wurde. Für die anschließende Farbreaktion wurde nach einer Inkubation von 15 min 20 mg o-Phenylendiamin (o-PD) in 10 ml Phosphat-Citrat-Puffer mit 4 µl 30% H₂O₂ gelöst und in die wells pipettiert. Je nach Farbintensität erfolgte das Abstoppen der Reaktion mit 3N H₂SO₄. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 492 nm im Photometer bestimmt.

3.2. Methoden der Zellbiologie

3.2.1. Zellkultur

In der Zellkultur wurde unter Berücksichtigung allgemein anerkannter Verhaltensregeln unter der Sterilbank gearbeitet, die regelmäßig mit 70%igem Ethanol desinfiziert wurde. Für die Organentnahme wurden Scheren und Pinzetten vor Gebrauch bei trockener Hitze sterilisiert. Andere Geräte wie Pipetten, Glasflaschen oder Spitzen und Lösungen wurden für 20 min bei 120°C und 1 bar Überdruck autoklaviert bzw. steril filtriert. Die Zellen wurden in Inkubatoren bei einer Temperatur von 37°C, einer CO₂-Konzentration von 5 % und einer Luftfeuchte von 96 % kultiviert.

3.2.2. Gewinnung von Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten (LK)

Kulturmedium: RPMI-1640 (PAA Laboratories); 10 % FCS (Sigma); 100 mM HEPES (Sigma); 20 U/ml Penicillin (PAA Laboratories); 0,1 mg/ml Streptomycin (PAA Laboratories); 50 μ M 2-Mercaptoethanol (Roth)

Erythrozytenlyse-Puffer: 0,01 M KHCO_3 ; 0,15 M NH_4Cl ; 0,1 mM EDTA; pH 7,5

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet, Milz und drainierende LK entnommen und unter Verwendung eines 70 μ m- Zellsiebes eine Einzelzellsuspension in KM hergestellt. Nach Zentrifugation (600x g, 4°C, 6 min) erfolgte die Erythrozytenlyse durch Zugabe von 1 bis 2 ml Erythrozytenlyse-Puffer zum resuspendierten Zellpellet. Die Reaktion wurde durch Aufnahme in KM nach 1 min abgestoppt und erneut zentrifugiert. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der Zellzahl mithilfe der Neubauer-Zählkammer.

3.2.3. Gewinnung von Zellen aus dem Zentralen Nervensystem (ZNS) und der Lunge

Kulturmedium: RPMI-1640 (PAA Laboratories); 10 % FCS (Sigma); 100 mM HEPES (Sigma); 20 U/ml Penicillin (PAA Laboratories); 0,1 mg/ml Streptomycin (PAA Laboratories); 50 μ M 2-Mercaptoethanol (Roth)

Erythrozytenlyse-Puffer: 0,01 M KHCO_3 ; 0,15 M NH_4Cl ; 0,1 mM EDTA; pH 7,5

Verdauansatz: je ZNS oder Lunge 25 ml KM + 10 μ g/ml DNase I (Roche) + 0,5 mg/ml Collagenase D (Roche)

Die Mäuse wurden durch die Inhalation mit Diethylether (Fischar) getötet. Um das periphere Blut zu entfernen wurden 10 ml PBS mithilfe einer Spritze in das linke Herz-Ventrikel injiziert. Der rechte Ventrikel wurde mit einer Schere eröffnet, um ein Abfließen des Blutes zu ermöglichen. Die Lunge konnte unmittelbar nach Spülen des Blutkreislaufes aus dem Brustkorb entnommen werden. Für die Präparation des ZNS wurde der Schädel und die Wirbelsäule mittels einer kleinen Schere geöffnet. Dadurch wurden Rückenmark und Gehirn sichtbar und konnten so mit einer Pinzette gelöst und entnommen werden.

Die so gewonnenen Organen wurden in einem weiteren Schritt mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten und in jeweils 25 ml Verdauansatz (mit Collagenase und DNase) in sterilen Glasflaschen mit Magnetührstäbchen überführt. Der Verdauansatz wurde 1 h bei 37°C im Wasserbad unter Rühren inkubiert. Danach wurde der Ansatz über ein 70 μ m- Zellsieb gefiltert und mit KM gewaschen.

Für die Isolation von Lymphozyten aus dem ZNS wurde das Pellet in 5 ml 40 % Percoll (*Percoll Separating Solution*, density 1.124 g/ml, Biochrom) resuspendiert und auf 3 ml 70 % Percoll in einem Zentrifugenröhrchen überschichtet. Anschließend wurden die Röhrchen bei Raumtemperatur, 550x g 30 min lang ohne Bremse zentrifugiert. Die Interphase wurde mittels einer Glaspasteurpipette abgenommen und dreimal mit KM gewaschen.

Für die Isolation von Leukozyten aus der Lunge wurde das Zellpellet in 10 ml 35 % Percoll resuspendiert und bei Raumtemperatur, 550x g für 10 min zentrifugiert. Nach Verwerfung des Überstandes wurde das Zellpellet dreimal mit KM gewaschen.

Nach Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen auf eine bestimmte Zellkonzentration eingestellt.

3.2.4. *In vitro* Generierung von *Bone Marrow-derived Dendritic Cells* (BMDCs)

Kulturmedium: RPMI-1640 (PAA Laboratories); 10 % FCS (Sigma); 100 mM HEPES (Sigma); 20 U/ml Penicillin (PAA Laboratories); 0,1 mg/ml Streptomycin (PAA Laboratories); 50 μ M 2-Mercaptoethanol (Roth); 10 % GM-CSF (Kulturüberstand muGM-CSF-produzierender Zell-Linie Ag8653; Svensson *et al.*, 1997 [185])

Erythrozytenlyse-Puffer: 0,01 M KHCO_3 ; 0,15 M NH_4Cl ; 0,1 mM EDTA; pH 7,5

Zunächst wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet, Femur und Tibia freipräpariert, und die Knochen von den Gelenken abgetrennt. Mittels einer Kanüle (25G) wurde das Knochenmark mit KM aus den Knochenstücken gespült und in KM aufgenommen. Die erhaltene Einzelzellsuspension wurde durch ein 70 μ m-Zellsieb filtriert. Nach Zentrifugation (300x g, 4°C, 6 min) erfolgte die Erythrozytenlyse durch Zugabe von Lysepuffer zum resuspendierten Pellet. Die Reaktion wurde wiederum durch Mediumzugabe nach 1 bis 2 min abgestoppt und der Ansatz unter den genannten Bedingungen zentrifugiert. Schließlich erfolgte die Bestimmung der Zellzahl mithilfe der Neubauer-Zählkammer. Es wurden $6 \cdot 10^5$ Zellen in 20 ml KM in eine Zellkulturschale ausgesät und bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Am Tag 4 nach Isolation erfolgte ein Mediumwechsel: 10 ml Medium wurden entnommen und durch dieselbe Menge an frischem Medium (+ 10 % GM-CSF) ersetzt. Die so gereiften BMDCs wurden am Tag 7 nach Isolation geerntet.

3.2.5. Herstellung und Kultur muriner T-Zelllinien

Kulturmedium: RPMI-1640 (PAA Laboratories); 10 % FCS (Sigma); 100 mM HEPES (Sigma); 20 U/ml Penicillin (PAA Laboratories); 0,1 mg/ml Streptomycin (PAA Laboratories); 50 μ M 2-Mercaptoethanol (Roth)

Erythrozytenlyse-Puffer: 0,01 M KHCO_3 ; 0,15 M NH_4Cl ; 0,1 mM EDTA; pH 7,5

T-Zelllinien wurden durch polyklonale Aktivierung mittels *in vitro* generierter BMDCs und anti-CD3 hergestellt. Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet, um Milz und LK zu entnehmen (siehe 3.2.2 Gewinnung von Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten). Nach der Sortierung naiver T-Zellen ($\text{CD4}^+\text{CD62L}^+$) mithilfe des AutoMACS® wurden diese in einem Verhältnis von 10:1 mit den BMDCs zusammen kultiviert. Die BMDCs wurden mit 100 ng/ml LPS aktiviert. Als Antigen wurde 2,5 μ g/ml anti-CD3 in das KM gegeben.

Um polarisierte $\text{T}_\text{H}1$ -Linien zu erhalten, wurden die Zellen in Anwesenheit von rekombinantem IL-12 (10 ng/ml) und anti-IL-4 (10 μ g/ml) in KM stimuliert. Hingegen führt die Stimulation mit IL-6 (20 ng/ml), TGF- β (2 ng/ml), anti-IL-4 (10 μ g/ml) und anti-IFN- γ (10 μ g/ml) zur Differenzierung von naiven T-Zellen zu $\text{T}_\text{H}17$ -Zellen. $\text{T}_\text{H}0$ -Linien wurden ohne polarisierende Zusätze in KM stimuliert.

Sechs bis sieben Tage nach Ansetzen der Kultur wurden die Zellen geerntet und ein Teil der Zellen für den Nachweis der Zytokine im Durchflusszytometer (siehe 3.2.6.2 Intrazelluläre Färbung) mit PMA und Ionomycin für 4 h restimuliert

3.2.6. Durchflusszytometrie/ FACS

Im Durchflusszytometer können gefärbte Einzelzellen in Suspension anhand ihrer Lichtstreuungseigenschaften, sowie der emittierten Strahlung Fluoreszenz-gekoppelter Antikörper charakterisiert werden. Das Vorwärtsstreulicht (FSC, engl. *forward scatter channel*) ist dabei proportional zur Zellgröße, während das Seitwärtsstreulicht (SSC, engl. *side scatter channel*) Auskunft über die Granularität der Zelle gibt. Durch die Kombination drei verschiedener Laser (Tab.10) ist es möglich, mit

dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Durchflusszytometers (BD LSR II), bis zu 10 Fluoreszenzfarben zu messen. Zur Analyse befinden sich die Zellen in einer Trägerflüssigkeit und passieren einzeln über ein Schlauchsystem mittels Überdruck Laserstrahlen mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen. Die durch die Laserstrahlen angeregten Fluoreszenzfarbstoffe emittieren Licht einer bestimmten Wellenlänge, welches neben den Streulichtsignalen auf verschiedene *Photomultiplier* (PM) weitergeleitet werden. Durch die Kombination von *Longpass* (LP)- und *Bandpass* (BP)-Filtern ist es möglich, auch zwischen Fluorochromen zu differenzieren, die von den gleichen Lasern angeregt werden und deren Emissionswellenlängen nahe beieinander liegen (Tab.10).

Die gemessenen Signale werden durch die DiVa® Software verarbeitet und gespeichert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der FlowJo® Software von TreeStar.

Tab. 10. Setup des verwendeten Durchflusszytometers BD LSR II und die Fluorochrome, die gemessen werden können: Alexa-Farbstoffen (A), Allophycocyanin (APC), Indodicarbocyanin (Cy), Dyomics Farbstoffen (Dy), Fluorescein Isothiocyanat (FITC), R-Phycoerythrin (PE), Perdinin-Chlorophyll (PerCP).

Laser	BP	LP	Fluorochrom	Scatter
Rot (633 nm)	780/60	735	APC-Cy7, APC-A750	-
	710/50	685	Alexa700, Alexa680, Dy 682	-
	660/20	-	APC, Alexa647, Cy5	-
Blau (488 nm)	780/60	735	PE-Cy7, PE-A750	-
	695/40	685	PerCP-Cy5.5, PE-Cy5.5, PE-A700	-
	575/26	550	PE, PI	-
	530/30	505	FITC, Alexa488, Dy495, GFP	-
	488/10	-	-	SSC
Violett (405 nm)	670/14	635	Qdot655	-
	525/50	505	ViD, Cascade Yellow	-
	440/40	-	Pacific Blue	-

3.2.6.1. Oberflächenfärbung

PBS 1x: 136,9 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH₂PO₄; 7,9 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O

PBA: 0,25 % BSA (w/v); 0,02 % Natriumazid (w/v) in PBS

Die Markierung von Oberflächenmarkern auf Zellen mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern wurde in FACS-Puffer (= PBA) auf Eis durchgeführt. Für die Färbung wurden maximal $1 \cdot 10^7$ Zellen in FACS-Röhrchen oder Cluster-Tubes auf Eis und im Dunkeln in einem Endvolumen von 100 µl überführt. Die Zellen wurden mit PBA gewaschen und bei 600x g, 4°C 6 min zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen und das Zellpellet resuspendiert wurde, erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungen. Dafür wurden die Zellen 8 min mit anti-CD16/CD32 (10 µg/ml) und Ratten-IgG (10 µg/ml) in PBA inkubiert. Im Anschluss wurden die Fluorochrom-markierten Antikörper (Tab.4) in PBA entsprechend verdünnt und für weitere 10 min mit den Zellen inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut gewaschen und zentrifugiert. Bei der Verwendung von biotinylierten Antikörpern wurde anschließend Fluorochrom-gekoppeltes Streptavidin hinzugegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach wiederholtem Waschen mit PBA wurden nun die Zellen in 250-300 µl PBA aufgenommen und im Durchflusszytometer (BD LSR II) analysiert.

3.2.6.2. Intrazelluläre Färbung

PBS 1x: 136,9 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH_2PO_4 ; 7,9 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

PBA: 0,25 % BSA (w/v); 0,02 % Natriumazid (w/v) in PBS

PBA-S: 0,5 % Saponin (v/v) in PBA

2 % PFA: (w/v) in PBS

Brefeldin A: 5 mg/ml Brefeldin A (Sigma) in Ethanol; 1:1000

PMA: 5 µg/ml PMA in RPMI-1640 (PAA Laboratories); 1:1000

Ionomycin: 1 mg/ml Ionomycin in DMSO (AppliChem); 1:1000

Neben der Oberflächenfärbung können auch Zytokine mittels intrazellulärer Färbung im Durchflusszytometer nachgewiesen werden. Für die intrazelluläre Färbung müssen die Lymphozyten zunächst restimuliert werden. Dabei unterscheidet man zwischen polyklonaler und Antigen-spezifischer Restimulation.

Für die polyklonale Restimulation werden die Zellen unspezifisch mittels einer Kombination des Phorbolesters Phorbolmyristataacetat (PMA) und dem Ionophor Ionomycin (Iono) stimuliert. Aufgrund seiner chemischen Ähnlichkeit zu Diacylglycerol (DAG) aktiviert PMA die Proteinkinase C (PKC). Ionomycin besitzt die Fähigkeit wegen seiner hydrophoben Eigenschaften die Lipiddoppelschicht von Membranen zu durchdringen und erhöht den Calcium-Spiegel in der Zelle. Somit wird durch die Stimulation mit PMA und Iono die Zytokinproduktion ausgelöst.

Die Antigen-spezifische Aktivierung von T-Zellen hingegen erfolgte mit den entsprechenden Proteinen bzw. Peptiden. Dabei wurden Zellen aus MOG₃₅₋₅₅-immunisierten Mäusen mit MOG₃₅₋₅₅ (10 µg/ml) und die Zellen aus G6PI-immunisierten Mäusen mit G6PI (20 µg/ml) restimuliert. Für die Analyse Antigen-spezifischer T-Zellen aus Influenzavirus-infizierten Mäusen wurden die Zellen aus Milz oder Lunge mit folgenden Nukleoprotein-Peptiden (NP) aktiviert: NP₂₆₁₋₂₇₅, NP₃₁₁₋₃₂₅, NP₃₆₆₋₃₇₄ (10 µg/ml).

Zur Stimulation wurden Zellen in einer Konzentration von 0,5 bis $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml für 4 h unspezifisch bzw. 6 h Antigen-spezifisch bei 37°C, 5 % CO_2 und einer Luftfeuchte von 95 % kultiviert. Nach 1 h wurde Brefeldin A in einer Endkonzentration von 5 µg/ml zu den Zellen gegeben. Brefeldin A verhindert die Knospung der Transportvesikel des Endoplasmatischen Retikulums und blockiert somit den Vesikeltransport. Nach der Stimulation wurde wie oben beschrieben zunächst eine Oberflächenfärbung durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, um Proteinreste zu entfernen. Da Zellmembranen toter Zellen Antikörper unspezifisch binden können, wurden die Zellen mit einem aminreaktiven Lebend-Tot-Farbstoff (*viability dye*, ViD) gefärbt. Der Vorteil dieses Lebend-Tod-Ausschlusses ist die Kombination mit einer intrazellulären Färbung. ViD (LIVE/DEAD® Fixable Dead Cell Stain Kit, L34955, Invitrogen) wird 1:500 in PBS verdünnt. Die Zellen werden mit 50 µl der Verdünnung 20 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach Waschen der Zellen mit PBS erfolgte die Fixierung der Zellen mit 2 % PFA in PBS für 20 min auf Eis, das wiederum durch die Zugabe von PBA gestoppt wurde. Die Zellen wurden bei 600x g und 4°C 6 min zentrifugiert und mit PBS gewaschen. Als nächstes wurden die Zellen mit einem Saponin-haltigen Puffer (PBA-S) gewaschen, um die Zellen zu permeabilisieren und somit eine intrazelluläre Färbung zu ermöglichen. Saponin permeabilisiert die Zellen, so dass die Fluorochrom-gekoppelten Antikörper in die Zellen diffundieren können. Als nächstes wurden die unspezifischen Bindungen mit anti-CD16/CD32 (10 µg/ml) und Ratten-IgG (10 µg/ml) in PBA-S für 8 min

blockiert. Im Anschluss wurden die Fluorochrom-markierten Antikörper in PBA-S entsprechend verdünnt und für weitere 10 min mit den Zellen inkubiert. Die Zellen wurden einmal mit PBA-S und einmal mit PBA gewaschen, um die geöffneten Poren wieder zu verschließen. Zum Schluss wurden die Zellen in 250-300 µl PBA aufgenommen und im Durchflusszytometer (BD LSR II) analysiert.

Für die Auswertung der Daten wurden diese mit FlowJo® analysiert. Zunächst wurden die Dubletten ausgeschlossen und nur die einzelnen Zellen, sogenannte *Singlets* im FSC-A/ FSC-W-Plot markiert. Im nächsten Schritt wurden im SSC-A/ FSC-A-Plot die Lymphozyten ausgewählt. Für den Ausschluss toter Zellen wurde ViD gegen Pacific Blue dargestellt und nur die ViD-negative Population markiert. Nachdem die CD4⁺, CD8⁺ oder γδ T-Zellen ausgewählt wurden, konnte nun die Zytokinproduktion dieser einzelnen Zellpopulationen analysiert werden (z.B. die CD4⁺IL-17⁺ T-Zellen).

Allgemein bietet FlowJo® die Möglichkeit *frequency of parent* (Frequenz bezogen auf die ausgewählte Zellpopulation, z.B. CD4⁺ T-Zellen) oder *frequency of total* (Frequenz bezogen auf die Gesamtzellzahl) zu erfassen. In den *Dotplots* wird immer *frequency of parent* dargestellt, während für statistische Berechnungen *frequency of total* bzw. die daraus resultierende, berechnete absolute Zellzahl herangezogen wurde.

3.2.6.3. Färbung von Antigen-spezifischen T_H-Zellen über CD154

PBS 1x: 136,9 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH₂PO₄; 7,9 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O

PBA: 0,25 % BSA (w/v); 0,02 % Natriumazid (w/v) in PBS

PBA-S: 0,5 % Saponin (v/v) in PBA

2 % PFA: (w/v) in PBS

Brefeldin A: 5 mg/ml Brefeldin A (Sigma) in Ethanol; 1:1000

Es sollte die Zytokinproduktion Influenza-spezifischer T_H-Zellen analysiert werden. Dafür wurden die Zellen mit den Influenza-spezifischen NP-Peptiden restimuliert und die Antigen-spezifischen T_H-Zellen über CD154 identifiziert. Die Expression von CD154 ist abhängig von der Aktivierung der T_H-Zellen über den T-Zell-Rezeptor. Somit können Antigen-spezifische T_H-Zellen über CD154 charakterisiert werden[186].

Für die Analyse der Antigen-spezifischen Zytokinproduktion wurden die aus den Lungen isolierten Zellen ($1 \cdot 10^7$ Zellen/ml) 6 h in Kulturmedium mit 10 µg/ml des jeweiligen NP-Peptides oder PMA (5 ng/ml) und Ionomycin (1 µg/ml) stimuliert. Für die letzten 4 h wurde Brefeldin A (5 µg/ml) hinzugefügt. Danach wurden die Zellen in *Cluster-Tubes* überführt und zunächst mit PBS gewaschen. Wie bereits in Abschnitt 3.2.6.2 beschrieben wurde die Zellmembran toter Zellen mit dem aminreaktiven Lebend-Tod-Farbstoff (*viability dye*, ViD) gefärbt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 2 % PFA fixiert. Die Fixierung wurde durch die Zugabe von PBA gestoppt. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit PBA-S permeabilisiert. Die Blockierung unspezifischer Bindungen erfolgte wie oben beschrieben. Dann wurden die Zellen mit anti-CD4, anti-CD8, anti-CD154 und den Zytokin-spezifischen Antikörpern in PBA-S gefärbt. Abschließend wurden die Zellen mit PBA-S und mit PBA gewaschen. Für die Analyse im Durchflusszytometer (BD LSR II) wurden die Zellen in 250-300 µl PBA aufgenommen.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit FlowJo®. Zunächst wurden wieder die *Singlets* im FSC-A/ FSC-W, dann die lebenden Zellen im Plot ViD gegen Pacific Blue markiert. Durch die Darstellung von CD154 und CD4 in einem Plot konnten so die Antigen-spezifischen CD154⁺CD4⁺ T-Zellen markiert werden.

Anhand der Mediumkontrolle wird das *Gate* so gelegt, dass der Prozentsatz der CD154⁺CD4⁺ T-Zellen kleiner als 0,1 % ist. Dieses *Gate* wird auf die NP-stimulierte Probe übertragen.

3.2.7. Sortierung von Zytokin-produzierenden Zellen mittels *Cytokine Secretion Assay (CSA)* im FACSaria

PBS 1x: 136,9 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH₂PO₄; 7,9 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O

Kulturbedium: RPMI-1640 (PAA Laboratories); 10 % FCS (Sigma); 100 mM HEPES (Sigma); 20 U/ml Penicillin (PAA Laboratories); 0,1 mg/ml Streptomycin (PAA Laboratories); 50 µM 2-Mercaptoethanol (Roth)

Erythrozytenlyse-Puffer: 0,01 M KHCO₃; 0,15 M NH₄Cl; 0,1 mM EDTA; pH 7,5

MACS-Running Buffer (= MACS-Puffer): 2 mM EDTA; 0,5 % BSA in PBS (w/v)

PMA: 5 µg/ml PMA in RPMI-1640 (PAA Laboratories); 1:1000

Ionomycin: 1 mg/ml Ionomycin in DMSO (AppliChem); 1:1000

Das Prinzip der Sortierung von Zellen mittels BD FACSaria basiert auf demselben wie die Analyse von Zellen im Durchflusszytometer. Aus diesem Grund werden auch für diese Methode Fluoreszenzgekoppelte Antikörper verwendet (Tab.2). Der BD FACSaria im Institut für Immunologie verfügt über 2 luftgekühlte Laser (488 und 633 nm – grüner und blauer Laser). Dies erlaubt die simultane Messung von bis zu 7 Fluoreszenzparametern (sowie Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht). Der Unterschied zum BD LSR II besteht darin, dass die Zellen aufgefangen und entsprechend der markierten Antikörper sortiert werden können. Dabei hat man die Möglichkeit Zellen in einem Schritt zu sortieren, die über mehrere Marker definiert werden. In dieser Arbeit wurden IL-17-produzierende CD4⁺ T-Zellen mithilfe des *anti-mouse IL-17 Secretion Assays* im FACSaria sortiert, um eine möglichst reine Zellpopulation zu erhalten. Die sortierten Zellfraktionen wurden im Anschluss auf deren Reinheit geprüft, was als Re-analyse bezeichnet wird.

Für die erfolgreiche Durchführung des *Cytokine Secretion Assays* wurden folgende Vorbereitungen getroffen: das KM für den Sekretionsschritt wurde auf 37°C vorgewärmt. Die Zentrifuge, MACS-Running Buffer und KM (für die Verdünnung der Fang-Matrix) wurden auf 4°C gekühlt. Um den Verlust an Zellen sowie den mit der Sortierung verbundenen Stress für die Zellen soweit zu minimieren, wurde zügig gearbeitet und zusätzliche Schritte wie z.B. mehrfaches Zentrifugieren vermieden.

Für die Sortierung von Zytokin-produzierenden Zellen *ex vivo* G6PI- oder MOG₃₅₋₅₅-immunisierter Mäuse wurden die entsprechenden Organen entnommen (siehe 3.2.2 Gewinnung von Zellen aus Milz und Lymphknoten bzw. 3.2.3 Gewinnung von Zellen aus dem Zentralen Nervensystem (ZNS) und der Lunge) und eine Einzelzellsuspension hergestellt. Nach Anreicherung der CD4⁺ T-Zellen über die Depletion der CD8⁺B220⁺ Zellen mittels AutoMACS® (siehe Abschnitt 3.2.7.1 Sortierung von CD4⁺ T-Zellen mittels MACS) wurden die Zellen auf 1*10⁷ Zellen/ml eingestellt und ausplattiert. Die Zellen wurden polyklonal mit PMA und Ionomycin für 2 bis 3 h restimuliert. Wichtige Kontrollen dazu sind die unstimulierte Probe sowie parallel die Stimulation der Zellen für die intrazelluläre Färbung, wobei in diesem Fall neben PMA und Ionomycin auch Brefeldin A zu den Zellen gegeben wurde. Nach der Restimulation wurden die Zellen geerntet und die *wells* mit kaltem MACS-Puffer gespült. Die Zellen wurden mit ausreichend MACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert (10 min, 4°C, 600x g). Im nächsten Schritt wurden 80 µl 4°C kaltes KM und 20 µl Fang-Matrix (20 µg/ml, 1:5) pro 1*10⁷ Zellen dazu gegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 100 ml warmen KM (1*10⁷ Zellen → 1 ml/1*10⁵ Zellen) wurden die Zellen auf vier 50 ml

Falcons gesplittet, sodass sich in jedem Falcon 25 ml Zellsuspension befanden. Der Sekretionsschritt erfolgte für 30 min im Wasserbad bei 37°C. Die Falcons mussten alle 5 min gedreht werden, um die Zellsuspension regelmäßig zu mischen. Nach dem Sekretionsschritt wurde in jedes Falcon 25 ml kalter MACS-Puffer gegeben und die Zellen für 10 min auf Eis inkubiert. Nach dem Zentrifugieren (10 min, 4°C, 600x g) wurden die Zellen aus den einzelnen Falcons in ein FACS-Röhrchen zusammengeführt.

Die Zellen wurden zunächst mit anti-IL-17-Biotin (Tab.2) für 10 min auf Eis inkubiert. Nach dem Waschen mit MACS-Puffer wurde in einem zweiten Schritt SA-PE, anti-CD4-Dy495 und anti-CD62L-PE-Cy7 (Tab.2) zu den Zellen gegeben und erneut 10 min inkubiert. Um eine Voranreicherung der Zellen im AutoMACS® Separator durchzuführen, wurde zu dem Färbeansatz zusätzlich anti-Biotin MicroBeads gegeben (Tab.3) und die Zellen bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen mit MACS-Puffer wurden die IL-17 positiven Zellen mittels AutoMACS® Separator angereichert (Programm Posselds) und danach sofort am FACS Aria sortiert. Kurz vor dem Sortieren wurde zu den Zellen 1 µg/ml Propidium-Iodid (PI) zum Ausschluss toter Zellen gegeben. Tote Zellen besitzen die Fähigkeit Antikörper unspezifisch zu binden und müssen somit ausgeschlossen werden, um eine möglichst hohe Reinheit der sortierten Populationen zu bekommen. PI kann durch die beschädigte Zellmembran in tote Zellen eindringen und interkaliert dort in die Desoxyribonucleinsäure (DNA). PI besitzt ein Absorptionsmaximum bei 490 nm und ein Emissionsmaximum bei 635 nm und wird im PerCP Kanal detektiert.

Für die Sortierung wurde folgende *Gating* Strategie festgelegt und die CD4⁺CD62L⁻IL-17⁺ sowie CD4⁺CD62L⁻IL-17⁻ in FCS-beschichtete Röhrchen aufgefangen. Nach dem Sortieren wurden die Zellen mit KM gewaschen und dementsprechend weiter verwendet.

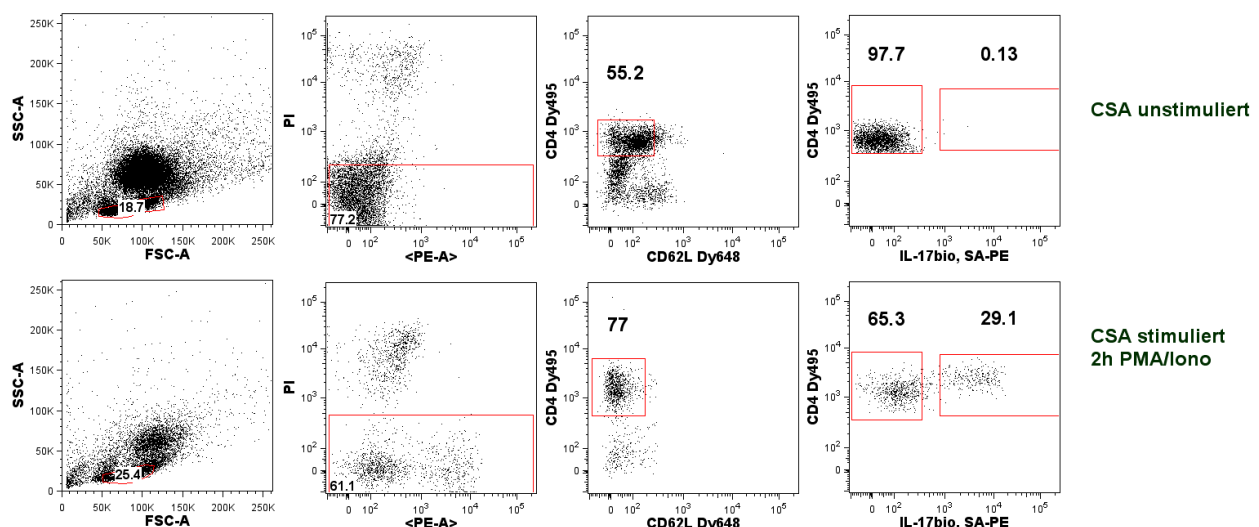


Abb. 3. Gating Strategie zur Sortierung von CD4⁺CD62L⁻IL-17⁺ und CD4⁺CD62L⁻IL-17⁻ T-Zellen mittels FACS Aria. Nach dem Ausschluss der toten Zellen (PI positiv) wurden die CD4⁺CD62L⁻ Zellen eingegrenzt, um schließlich die IL-17⁺ bzw. die IL-17⁻ Fraktion zu bestimmen. Die obere Reihe widerspiegelt die unstimulierte Kontrolle des CSA, während in der unteren Reihe die eigentliche Probe abgebildet ist. Diese Zellen wurden polyklonal mit PMA und Ionomycin 2 h restimuliert.

3.2.8. Sortierung von Zellen mittels *Magnetic Cell Sorting* (MACS)

PBS 1x: 136,9 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH_2PO_4 ; 7,9 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

MACS-Running Buffer (= MACS-Puffer): 2 mM EDTA; 0,5 % BSA in PBS (w/v)

MACS-Rinsing Solution: 2mM EDTA in PBS

MACS-Cleaning Solution: 70 % Ethanol (v/v)

Spezifische Zellpopulationen können unter geringem Zeitaufwand mithilfe des MACS (engl.: *magnetic cell sorting*, MACS®) Verfahrens aus komplexen Zellgemischen für weitere Untersuchungen isoliert werden. Dabei werden mit superparamagnetischen Mikropartikeln (ca. 50 nm Durchmesser) konjugierte Antikörper (MicroBeads) verwendet. Mit diesen MicroBeads werden die gewünschten Zellen spezifisch markiert und auf eine spezielle Trennsäule gegeben, die mit Stahlkügelchen gefüllt ist und sich zwischen den Magnetpolen eines Hochleistungsmagneten befindet. Dabei entsteht ein Hochgradientenfeld, so dass die markierten Zellen in der Säule festgehalten werden, während unmarkierte Zellen durch die Säule gespült und als negative Fraktion aufgefangen werden können. Die markierten Zellen werden durch Elution der Säule außerhalb des Magnetfelds gewonnen.

Die Zellaufreinigung mit magnetischen Partikeln kann, je nach Durchflussgeschwindigkeit und verwendeter Säule, zur Anreicherung (positive Selektion) oder zur Depletion (negative Selektion) von speziellen Zellpopulationen verwendet werden. Die Wahl der Methode hängt von der Art der Untersuchung und von der zu isolierenden Zellpopulation ab.

Die Zellen wurden wie unter 3.2.2 bzw. 3.2.3 beschrieben, vorbereitet. Die Zellen wurden in einer Zellkonzentration von etwa 1×10^7 Zellen pro 100 μl in MACS-Puffer aufgenommen. Die MicroBeads wurden der Zellsuspension in der vom Hersteller angegebenen Verdünnung hinzugefügt und die Zellen 15-20 min bei 2-8°C (im Kühlschrank) inkubiert. Ungebundene MicroBeads wurden durch Waschen mit MACS-Puffer beseitigt und das Zellgemisch in einer Zellkonzentration von bis zu 1×10^8 Zellen/ 500 μl MACS-Puffer am AutoMACS® Separator mit dem geeigneten Programm sortiert. Vor und nach der Separierung wurden Zellaliquots entnommen und durchflusszytometrisch untersucht, um die Effektivität (Reinheit und Ausbeute) der Sortierung zu überprüfen.

3.2.8.1. Sortierung von CD4^+ T-Zellen mittels MACS

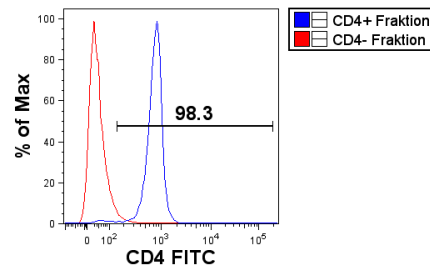
Für die Stimulation der IL-17-produzierenden Zellen wurden CD4^+ T-Zellen mittels MACS angereichert. Die CD4^+ T-Zellen wurden dabei indirekt über die Depletion von $\text{CD8}^+\text{B220}^+$ Zellen sortiert. Die Zellen wurden mit anti-B220-Biotin und anti-CD8-Biotin (Tab.2) für 10 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit anti-Biotin MicroBeads laut Herstellerangaben (Tab.3.). Die Zellen wurden schließlich mithilfe des AutoMACS® Separators sortiert (Programm deplete).

3.2.8.2. Sortierung naiver T_H -Zellen mittels MACS

Naive T_H -Zellen für die *in vitro* Generierung von T-Zelllinien wurden über eine magnetische Zweischnitt-Zellsortierung mittels des anti-FITC MultiSort Kits (MiltenyiBiotec) gewonnen. In einem ersten Schritt wurden CD4^+ T-Zellen angereichert, von denen im Anschluss die CD62L^+ Zellen aufgereinigt wurden. Die Expression von CD62L ist auf naiven T_H -Zellen sehr hoch und wird nach Aktivierung herunterreguliert. Zunächst wurden Splenozyten primär mit anti-CD4-FITC markiert, gewaschen und anschließend mit anti-FITC-MicroBeads markiert, gewaschen und am AutoMACS® Separator aufgetrennt. Der

paramagnetische Teil der anti-FITC MicroBeads wurde mit dem im Kit enthaltenen Enzym laut Herstellerangaben abgespalten und mithilfe des AutoMACS® Separator von den CD4⁺ T-Zellen getrennt. Nun wurden die Zellen mit anti-CD62L-Beads markiert und erneut mittels AutoMACS® Separator sortiert. Die auf diese Weise erhaltenen CD4⁺CD62L⁺ Zellen waren in allen Versuchen mindestens 98 % CD4⁺ und mindestens 74 % CD4⁺CD62L⁺.

1. Sortierung der Gesamtzellpopulation auf CD4



2. Sortierung der CD4⁺ T-Zellen auf CD62L

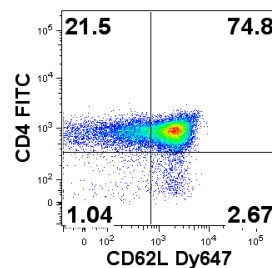


Abb. 4. Sortierung naiver T_H-Zellen mithilfe des anti-FITC MultiSort Kits. Im ersten Schritt wurden CD4⁺ T-Zellen aus der Gesamtzellpopulation sortiert. Eine Einzelzellsuspension wurde zunächst mit anti-CD4-FITC inkubiert. Im Anschluss wurden die CD4⁺ T-Zellen über anti-FITC MicroBeads im AutoMACS® Separator sortiert. Dann erfolgte eine Inkubation mit dem *Release Reagent* des anti-FITC MultiSort Kits. Dabei wurden die gebundenen MicroBeads von den Zellen enzymatisch entfernt. In einem zweiten Schritt wurden dann die CD62L⁺ Zellen mittels anti-CD62L MicroBeads aus den CD4⁺ T-Zellen sortiert.

3.3. Methoden der Molekularbiologie

3.3.1. Isolation genomischer DNA aus Schwanzbiopsien

Verdaupuffer: 50 ml 1M NaCl; 50 ml 1% SDS; 250 ml 0,1M Tris-HCl pH8,0; 10ml 0,5M EDTA; ad 450ml H₂O; steril filtriert

Die Mausschwanzbiopsien wurden ÜN (mindestens 3 h) bei 55°C mit 500 µl Verdaupuffer und 165 µg Proteinase K (Sigma) inkubiert. Im Anschluss wurde das Gemisch 10 min bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand, der die genomische DNA enthält, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl 100 % Isopropanol gemischt, um die DNA zu fällen. Der Ansatz wurde 20 min bei 4°C zentrifugiert (13.000 rpm), wonach der Überstand abgenommen wurde. Durch Zugabe von 350 µl 70 %-igem Ethanol (-20°C) wurde das DNA-Pellet gewaschen. Nach Zentrifugation (10 min, 4°C, 13.000 rpm) wurde der Überstand verworfen und die DNA getrocknet (60°C, 500 rpm im Thermomixer, etwa 10 min) um die Ethanolreste zu beseitigen. Die getrocknete DNA wurde in 400 µl H₂O resuspendiert (60°C, 500 rpm im Thermomixer, 10 min).

3.3.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Genotypisierung der C57BL/6_IL-17 ko Mäuse

Taq-Polymerase: 5 U/μl BioTherm-Polymerase (GeneCraft)

Agarose: peq Gold Universal Agarose (peQ Lab)

50x TAE-Puffer: 2 M Tris; 0,95 M Essigsäure; 50 mM EDTA; ad 1 l ddH₂O; autoklavieren

10x Probenpuffer: 50% Glycerol (v/v); 50 mM EDTA; 0,1% Bromphenol-Blau; ad 10 ml ddH₂O

1 kb DNA Größenstandard: GeneCraft 1kb *Ladder*

Zur Genotypisierung von C57BL/6 IL-17 ko Mäusen wurde ein Fragment aus der genomischen DNA von Schwanzbiopsien amplifiziert. Für die Genotypisierung wurden 3 verschiedene Primer verwendet (siehe 2.6).

Die Kombination aus Primer 1 (*sense*) und Primer 2 (*antisense*) ergibt ein Fragment einer Größe von 1,3 kb. Diese Größe entspricht dem Wildtyp-Fragment. Die Kombination hingegen aus *forward* Primer 1 (*sense*) und Primer 3 (*antisense*) ergibt ein Fragment mit einer Größe von 0,5 kb, welches die mutante Form widerspiegelt. Die *Annealing*-Temperatur betrug 61°C und es wurden 34 PCR-Zyklen durchgeführt. Da die Amplifikation der Ziel-DNA ausschließlich analytischen Zwecken diente, wurde für die PCR eine thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerase ohne sogenannte *proof-reading*-Aktivität (3'-5'-Exonukleaseaktivität) verwendet.

Ein PCR-Ansatz enthielt: 1x PCR-Puffer; 0,2 mM dNTPs (GeneCraft); 500 nM *forward* Primer; 500 nM *reverse* Primer 1; 500 nM *reverse* Primer 2; 1,25 U Polymerase (5 U/μl, Biotherm Taq, GeneCraft); 2,5 μl genomische DNA; add 25 μl H₂O. Die PCR-Bedingungen (PCR ThermoCycler, Biometra) wurden wie folgt gewählt:

Prä-Denaturierung bei 95°C	für 5 min	} 34 Zyklen
Denaturierung bei 95°C	für 30 sec	
<i>Annealing</i> bei 61°C	für 30 sec	
Elongation bei 72°C	für 1 min	
Post-Elongation bei 72°C	für 10 min	
4°C	∞	

Im Anschluss erfolgte die Analyse auf einem 1%-igen Agarose-Gel (Agarose durch Aufkochen in 1x TAE-Puffer lösen, vorsichtig abkühlen und 0,5 μg/ml Ethidiumbromid zur späteren Visualisierung der DNA unter UV zugeben). Dafür wurden 10 μl der PCR-Probe mit 2 μl 5x DNA-Probenpuffer gemischt und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für ca. 30 bis 45 min bei 160 V. Schließlich konnten unter UV die amplifizierten DNA-Fragmente sichtbar gemacht und ihre Größe anhand des ebenfalls aufgetragenen DNA-Größenstandards (GeneCraft 1 kb DNA *Ladder*) bestimmt werden.

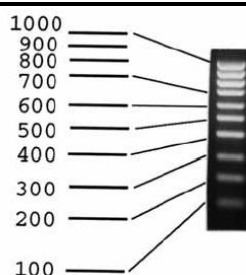


Abb. 5. DNA-Größenstandard 1kb DNA Ladder von Genecraft.

3.3.3. Nachweis der Viruslast in der Lunge Influenzavirus-infizierter Mäuse

Der Nachweis der Viruslast erfolgte am Institut für Virologie und Antivirale Therapie, Universitätsklinikum Jena und wurde von Heike Urban durchgeführt.

Für den Nachweis der Viruslast wurde Gesamt-RNA aus dem Lungengewebe mittels der Chloroform-Methode gewonnen [187]. Die RNA Menge wurde quantifiziert und eine definierte Menge für die Reverse Transkription eingesetzt. Nach *Annealing* der Oligo (dT) Primer für 10 min bei 70°C erfolgte die Inkubation mit 100 U Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) und dem entsprechenden Puffer (10 mM DTT sowie 1 mM dNTPs) für 50 min bei 42°C. Mithilfe der SYBR Green basierenden PCR (Qiagen, Hilden) im LightCycler 3 technology (Roche) erfolgte die Bestimmung der relativen Genexpression des Influenzavirus M2 Gens im Vergleich zu β -Aktin als interne Kontrolle (Primerkombinationen siehe 2.6).

Zunächst wurde die quantitative PCR bezüglich der vergleichbaren Effizienz zwischen der M2- und β -Aktin-Expression mithilfe der Anleitung von Roche verglichen. Danach wurde die M2 Genexpression in den Proben der Influenzavirus-infizierten Mäuse mittels einer relativen Quantifizierungsmethode analysiert [188].

3.3.4. Nachweis der mRNA-Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren mittels RT-PCR

Die RNA-Quantifizierung wurde freundlicherweise von Maria Lexberg (AG Zellbiologie, DRFZ) durchgeführt. Die Expression der einzelnen Gene wurde mithilfe der Expression von Hypoxanthin-Guanin-Phosphoryltransferase (HPRT) normalisiert. Folgende Transkriptionsfaktoren wurden mittels RT-PCR detektiert: ROR γ t, Für ROR α , GATA-3 und T-bet (Primerkombinationen siehe 2.6).

3.3.5. Microarray

Mittels der Microarraytechnologie wurde die transkriptomische Regulation aller ca. 45.000 Gene über *whole genome expression bead chips* analysiert.

3.3.5.1. RNA-Isolation aus Lungengewebe

Die Isolation zellulärer RNA aus dem Lungengewebe erfolgte mit dem *RNeasy Mini Kit* der Firma Qiagen® (Hilden, Deutschland) laut Herstellerangaben. Dafür wurden 30 mg des Schock gefrorenen Gewebes mithilfe einer Kugelmühle (Tissue Lyser Qiagen®, produziert von Retsch, Haan, Deutschland) mechanisch lysiert. Die eluierte RNA wurde direkt auf Eis gestellt und nach Konzentrationsmessung bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

3.3.5.2. Konzentrationbestimmung und Qualitätskontrolle der isolierten RNA

DEPC-H₂O: 0,1 % DEPC v/v: Zugabe von 1 ml DEPC zu 1 l A.dest, Inkubation ÜN bei 37°C, autoklavieren

10x MOPS Puffer: 0,2 M MOPS; 50 mM NaAcetat, 10 mM EDTA; pH 7,0; sterilfiltrieren; Lagerung bei -20°C

1x Laufpuffer: 10x MOPS in DEPC-H₂O verdünnen

deanturierendes Agarosegel: 1,5 % Agarose in Laufpuffer mit 220 mM Formaldehyd

5x RNA-Probenpuffer: 16 μ l gesättigte Bromphenolblaulösung; 80 μ l 0,5 M EDTA pH 8,0; 100 μ l Ethidiumbromid (10 mg/ml); 720 μ l 37% Formaldehyd; 2 ml 100 % Glycerol; 3084 μ l Formamid; 4 ml 10x MOPS Puffer, ad 10 ml DEPC-H₂O; Lagerung bei -70°C

Die Konzentration der RNA wurde mittels UV/Vis-Spektrophotometrie mittels *NanoDrop® ND-1000* der Firma NanoDrop Technologies Inc. (Wilmington, USA) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Neben der Konzentration (ng/µl) werden durch die spezialisierte Software noch der Quotient aus 260/280 und 260/230 jeder Probe bestimmt. Der Quotient aus der Probenabsorption bei 260 und 280 nm gibt Aufschluss über die Reinheit der Nukleinsäure. Werte unter 2,0 weisen auf eine Verunreinigung der Probe mit Proteinen, Phenol oder anderem im Bereich 280 nm stark absorbierenden Kontaminationen hin. Ein weiteres Qualitätsmerkmal der RNA wird durch den Quotient der Probenabsorption bei 260 und 230 nm festgelegt. Dieser Wert gibt Aufschluss über niedermolekulare Verunreinigungen wie Puffersubstanzen, Detergentien und Phenol und liegt in der Regel zwischen 1,8 und 2,2.

Die Überprüfung der RNA Qualität beruht auf der Basis der ribosomalen Untereinheiten 28S- und 18S-rRNA in einem denaturierenden Agarosegel. Dafür wurden zu jeweil 5 µg Gesamt-RNA 5x RNA-Probenpuffer gegeben, gut gemischt und der Ansatz für 10 min bei 65°C denaturiert, anschließend für eine Minute auf Eis abgekühlt. Dem denaturierenden Agarosegel wurde ein Elektrophoresevorlauf von 10 min bei 120 V in 1x Laufpuffer gewährt und schließlich die Proben aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für etwa eine Stunde bei 120 V (~ 60 mA), die Auftrennung der rRNA wurde am UV-Tisch überprüft und das Gel schließlich unter UV-Transition fotografiert.

3.3.5.3. Aliquotierung der RNA für die Amplifikation

Nach der Konzentrationsbestimmung und der Qualitätsanalyse der RNA wurden für die RNA-Amplifikation je 500 ng RNA in 11 µl RNase freiem Wasser in Eppendorf Reaktionsgefäße aliquotiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80° gelagert.

3.3.5.4. Charakteristik des eingesetzten Microarrays

In dieser Arbeit wurden „*Whole-Genome Expression BeadChips*“ der Firma Illumina® (Typ Mouse WG-6 v2.0) verwendet. Insgesamt können über 45.200 Transkripte detektiert werden. Ein *BeadChip* besteht aus 6 Arrays, sodass 6 Proben pro *Chip* aufgetragen werden können. Die 3 µm großen Beads sind mit DNA Oligonukleotiden beladen und werden vom Hersteller über eine Array Matrix aufgetragen. Die Verteilung der *Beads* erfolgt dabei zufällig. Jeder *Bead*-Typ und demzufolge jedes Oligonukleotid (bestehend aus 50 Basen) ist ca. 30 Mal (mindestens 5 Mal) vorhanden. Aufgrund der individuellen Anordnung der *Beads* existiert zu jedem *Chip* eine Dechiffrierungs-CD. Zusätzlich ist jeder *Bead* über eine 29 Basen-Adressierungssequenz charakterisiert. Darüber kann mithilfe der Software die Lokalisierung des jeweiligen *Beads* auf dem Array bestimmt werden. Die gemessenen Fluoreszenzsignale können so den entsprechenden Oligonukleotiden zugeordnet werden. Die amplifizierte cRNA bindet im Hybridisierungsschritt an komplementäre Bead-gebundene Oligonukleotide und wird schließlich mittels Streptavidin-Cy3 gefärbt.

Die Microarrays wurden in Kooperation mit dem Institut für Experimentelle Anästhesie, Universitätsklinikum Jena von Markus Blaess durchgeführt.

3.3.5.5. RNA-Amplifikation und Labeling

Die Amplifikation und Biotinylierung der Gesamt-RNA wurde laut Herstellerangaben des *Illumina® TotalPrep RNA Amplifikation Kit* der Firma Ambion (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)

durchgeführt. Nach der reversen Transkription (oligo(dT) Primer, Transkriptase *Array Script*[™]) wird die erhaltene einzelsträngige cDNA in doppelsträngige cDNA umgewandelt. Diese cDNA wird aufgereinigt und mithilfe einer T7 RNA Polymerase *in vitro* umgeschrieben. Durch die Verwendung von Biotin UTP entstehen biotinylierte antisense RNA Kopien (cRNA). Nach Aufreinigung der biotinylierten cRNA kann diese direkt in die Hybridisierung der *Arrays* eingesetzt werden.

3.3.5.6. Hybridisierung, Färben und Waschen der Microarrays

Die Schritte Hybridisierung, Färben und Waschen der Microarrays wurden laut Herstellerangaben nach dem *Whole-Genome Gene Expression with IntelliHybTMSeal* der Firma Illumina® (SanDiego, CA, USA) durchgeführt. Für die Hybridisierung wurden 1,5 µg RNA eingesetzt. Der Hybridisierungsschritt erfolgte für 18 h bei 55°C im Hybridisierungssofen der Firma Illumina® unter vorsichtigem Wippen statt. Nach der Hybridisierung wurde die ungebundene cRNA gewaschen. Die hybridisierte biotinylierte RNA wurde mit Streptavidin-Cy3 gefärbt. Nach wiederholtem Waschen wurden die *BeadChips* getrocknet und das Fluoreszenzsignal über den *BeadArray Reader 500 X* (Illumina®) gescannt. Die Verarbeitung der Rohdaten erfolgte mit dem *Bead Studio*-Software (Illumina Systems and Software 2005. *BeadStudio* Users Guide. Data Analysis Software for Use with Illumina Gene Expression Products. Doc. #11179632 Rev.B).

3.3.5.7. Statistische Analysen und bioinformatische Analysen

Die statistischen Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Matthias Kohl (Paul-Martini Sepsis Forschungsgruppe; Universitätsklinikum Jena) durchgeführt. Die Analyse der Daten sowie die Erstellung der Illustrationen erfolgte mittels der *Software R* (www.R-project.org) und dessen Erweiterung *Bioconductor* [189].

3.4. Tierversuche

Für alle Tierversuche wurden Mäuse im Alter von 6-10 Wochen verwendet. Die Mäuse wurden unter SPF (Spezifiziert Pathogen Erei) Bedingungen in der Tierzucht des IVTK (Institut für Versuchstierkunde, Jena-Lobeda) gezüchtet. Die Haltung erfolgte unter standardisierten Bedingungen (Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 h; Fütterung von Atlromin-Pellets #1326, Wasser *ad libitum*). Alle Tierversuche waren vom Thüringer Landesverwaltungsamt genehmigt.

3.4.1. Induktion der G6PI-induzierten Arthritis

Die G6PI-induzierte Arthritis wurde in dieser Arbeit als Möglichkeit zur Sortierung und Analyse IL-17⁺ CD4⁺ T-Zellen *ex vivo* genutzt.

Zur Induktion der G6PI-induzierten Arthritis wurden 400 µg rekombinantes humanes G6PI und DBA/1 Mäuse (suszeptibler Stamm) verwendet. Die G6PI-Stocklösung wurde mit PBS auf 4 mg/ml verdünnt und mit dem gleichen Volumen CFA (Freund's Adjuvant complete; SIGMA; 1 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis* H37RA) mittels Ultraschall emulgiert bis eine weiße Emulsion entstand. Diese Emulsion wurde luftblasenfrei in eine Spritze aufgezogen und je 100 µl der Emulsion links und rechts an der Schwanzbasis subkutan (s.c.) appliziert.

Nach ca. 9 Tagen entwickeln die Mäuse eine periphere symmetrische Arthritis in den Vorder- und Hinterpfoten. Für die Sortierung IL-17-produzierender CD4⁺ T-Zellen wurden die Mäuse jedoch schon zu einem früheren Zeitpunkt (Tag 7 nach Immunisierung) abgetötet, sodass eine Bewertung der Mäuse mithilfe eines klinischen Scores nicht notwendig war.

3.4.2. Induktion einer Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE)

Die EAE wurde in dieser Arbeit als eine weitere Möglichkeit genutzt, um IL-17-produzierende CD4⁺ T-Zellen *ex vivo* zu analysieren.

Für die Immunisierung von C57BL/6 Mäusen wurde 200 µg MOG₃₅₋₅₅ eingesetzt. Die Peptid-Stocklösung wurde mit PBS auf 4 mg/ml verdünnt und mit dem gleichen Volumen CFA (Freund's Adjuvant complete; SIGMA; 1 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis* H37RA) mittels Ultraschall zu einer homogenen, festen Emulsion vermischt. Diese Emulsion wurde luftblasenfrei in eine Spritze aufgezogen und jeweils 50 µl an der rechten und linken Schwanzbasis subkutan injiziert. Zusätzlich wurde 200 ng Pertussistoxin (*Bordetella pertussis*, SIGMA; 200 ng/µl) in 100 µl PBS in die Schwanzvene appliziert. Dafür wurden die Tiere kurze Zeit mit Rotlicht bestrahlt, um die Durchblutung der Schwanzvene zu erhöhen und somit die Schwanzvenen besser zu erkennen. Am Tag 2 nach Immunisierung wurde den Tieren auf die gleiche Weise 200 ng Pertussistoxin intravenös appliziert.

Die Mäuse wurden ab dem Tag der Immunisierung täglich auf EAE-Symptome kontrolliert, wobei nach folgendem klinischen Index (Score) bewertet wurde:

1. Der Schwanz ist gelähmt. (Schwanzparalyse)
2. Die Hinterbeine sind in ihrer Funktion stark eingeschränkt. (Paraplegie)
3. Die Hinterbeine sind gelähmt. (Paralyse)
4. Die Vorderbeine sind gelähmt. (Tetraplegie)
5. Die Maus ist moribund.

3.4.3. Infektion mit Influenzavirus

Die Influenza-Infektion wurde in Kooperation mit Dr. Andreas Henke vom Institut für Virologie und Antivirale Therapie, Jena durchgeführt.

Für die intranasale (i.n.) Infektion wurden die Mäuse mit Diethylether narkotisiert. 50 µl Virusstocklösung wurden mit einer Pipette aufgezogen und die narkotisierte Maus am Rücken und im Nacken gehalten. So konnte die Virusstocklösung langsam auf die Nase geträufelt werden. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Mäuse die Lösung komplett einatmen. Danach wurden die Mäuse in den Käfig zurückgelegt und so lange beobachtet, bis die Vitalitätszeichen dem Normalzustand entsprachen.

Die Mäuse wurden jeden Tag begutachtet und gewogen. Bei Gewichtsverlusten von mehr als 30 % wurden die Tiere euthanisiert.

3.4.4. Sekundäre bakterielle Infektion mit *Streptococcus pneumoniae*

Die sekundäre bakterielle Infektion wurde in Kooperation mit Dr. Martin Witzernath und Katrin Reppe in der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie an der Charité Berlin durchgeführt. Zur Durchführung der Versuche wurden weibliche C57BL/6NCrl Wildtyp Mäuse

(Inzuchtstamm Charles River Laboratories (Niederlassung Sulzfeld, Deutschland)) in einem Alter von 8-10 Wochen mit einem Körpergewicht von 18-22 g verwendet.

Die Anzucht von *S.pneumoniae* sowie die Infektion wurden von Katrin Reppe durchgeführt.

Für die Doppelinfektion wurden C57BL/6 Mäuse zunächst mit einer geringen Infektionsdosis H1N1 infiziert (siehe 3.4.3 Infektion mit Influenzaviren). Die sekundäre bakterielle Infektion erfolgte am Tag 5 nach der Influenzavirus A Infektion. Dafür wurden die Tiere nach Bestimmung der Körpertemperatur und der Körpermasse mit einem Gemisch aus 90 mg/kg KM Ketamin und 15 mg/kg KM Xylazin i.p. narkotisiert. Zum Schutz der Kornea vor Austrocknung erhielten die Tiere Bepanthen® Augen- und Nasensalbe in den Konjunktivalsack. Nach Kontrolle der korrekten Narkosetiefe wurden die Versuchstiere unter der Sterilbank in einer speziell angefertigten kastenartigen Haltevorrichtung an den oberen Schneidezähnen fixiert. Nun wurden jeder Maus 10 µl der Infektionslösung oder PBS pro Nasenloch intranasal mit einer 10µl-Pipette verabreicht. Im Anschluss wurden die Tiere zurück in den Käfig gebracht und während der Aufwachphase unter Rotlicht in einer ruhigen Umgebung überwacht.

Die vorbehandelten Tiere wurden im Anschluss an die Infektion für eine Dauer von 10 Tagen überwacht. Während des Versuchszeitraumes wurde das Allgemeinbefinden und der klinische Zustand der Tiere beobachtet und dokumentiert. Weiterhin erfolgte die Bestimmung von Körpertemperatur und Körpermasse. War die Erkrankung bei einem Tier soweit fortgeschritten, dass kurzfristig mit einem letalen Verlauf gerechnet werden musste und sein Leiden ein ethisch vertretbares Maß überschritt, erfolgte die Euthanasie dieses Tieres (zervikale Dislokation nach Ketamin/Xylazin-Narkose). Hierfür wurden die Handlungsanweisungen nach den „Empfehlung des Arbeitskreises Berliner Tierschutzbeauftragter für die vorzeitige Tötung erheblich leidender Versuchstiere“ (Stand 21.01.1997) zugrunde gelegt.

Nach 10-tägiger Beobachtungsfrist wurden alle überlebenden Tiere mittels intraperitonealer Ketamin/Xylazin Injektion narkotisiert und durch zervikale Dislokation getötet.

3.4.5. Intraperitoneale Applikation von Antikörpern

Für die intraperitoneale (i.p.) Injektion wurde die entsprechende Menge an Antikörper in PBS verdünnt. Die Antikörperlösung wurde in eine Spritze aufgezogen. Die Mäuse wurden am Nacken und am Rücken gefasst, sodass sie in ihrer Bewegungsfreiheit eingeschränkt waren. Die Einstichstelle wurde vor der Applikation desinfiziert. Dann erfolgte die Applikation der Antikörperlösung ins Peritoneum, wobei maximal 500 µl appliziert wurden. Nach der Injektion wurden die Mäuse in den Käfig zurückgesetzt und abgewartet bis die Vitalitätszeichen dem Normalzustand entsprachen.

3.5. Histologie

PBS 1x: 136,9 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH₂PO₄; 7,9 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O

2 % bzw. 4% PFA: (w/v) in PBS

Die Histologie sowie die immunhistochemischen Färbungen wurde in Kooperation mit Debrah Weih am Leibniz-Institut für Altersforschung in Jena (Arbeitsgruppe Prof. Falk Weih) durchgeführt. Die Gewebeschnitte wurden von Dr. Lucien Frappart (Leibniz-Institut für Altersforschung, Jena) begutachtet und bewertet.

3.5.1. Aufarbeitung der Lunge für histologische Untersuchungen

Für die histopathologischen Untersuchungen der Lunge wurden die Tiere zu den entsprechenden Zeitpunkten durch die Inhalation mit Diethylether narkotisiert. Die Perfusion erfolgte zunächst mittels 10 ml PBS welches mit einer Spritze in das linke Herzventrikel injiziert wurde. Das rechte Ventrikel wurde mit einem Schnitt eröffnet, um den Blutkreislauf komplett zu spülen. Als nächstes wurden ca. 10 bis 20 ml 4 % Paraformaldehyd (PFA) auf die gleiche Weise in den Kreislauf appliziert. Danach konnte die Lunge entnommen werden und in 4 % PFA zwei bis drei Tage fixiert werden. Nach der Fixierung erfolgte die Lagerung der Lungen in 50 % Ethanol bis zur Weiterverarbeitung.

Vor der Anfertigung von 6 µm dicken Schnitten mussten die Lungen zunächst entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet werden. Die Entwässerung des Gewebes geschieht in verschiedenen Schritten: als erstes wurde das Fixierungsmittel mit Wasser ausgewaschen. Danach erfolgte die eigentliche Entwässerung mit einer in der Konzentration aufsteigenden Alkoholreihe (Isopropanol 20 %, 40 %, 60 %, 80 %, 90 %, 100 %). Es folgte eine Inkubation in Xylol. Danach konnte das Gewebe in das heiße Paraffin eingebracht werden. Aus dem heißen Paraffin wurden die Gewebe in Blöckchen eingegossen und waren nach dem Erkalten fertig zum Schneiden.

Für die Anfertigung der Schnitte wurde ein Mikrotom benutzt (Zeiss, HYRAX M25), mit dem 6 µm dicke Scheiben des eingebetteten Gewebes angefertigt wurden. Vor dem Schneiden der Gewebe erfolgte die Kühlung der Paraffin-Blöcke auf Eis. Die erhaltenen Schnitte wurden auf einem Wasserbad aufgefangen und glatt auf einen Objektträger Superfrost plus slides (Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgezogen. Die aufgezogenen Schnitte wurden ÜN bei 37°C getrocknet und konnten am nächsten Morgen für histologische Untersuchungen verwendet werden.

3.5.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E-Färbung)

Die H&E-Färbung ist eine Routinefärbung. Damit erreicht man eine gute Darstellung des Gewebes, wobei die Zellkerne blau-violett und das Zytoplasma rosa erscheinen. Zusätzlich färben sich interzelluläre Substanzen an – so erscheinen z.B. Knorpel in violett oder Fasern in rosa.

Nachdem Auflegen der Schnitte auf einen Objektträger, wurden diese über eine absteigende Alkoholreihe in Wasser gelöst, mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt und durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert. Um die Stücke auf dem Objektträger luftdicht haltbar zu machen, wurde ein Deckglas mit einem Tropfen Kanadabalsam über dem Gewebstückchen fixiert.

3.5.3. Immunhistologie

Die Methode der Immunhistologie bietet die Möglichkeit Antigene mithilfe spezifischer Antikörper im Schnitt nachzuweisen. Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten immunhistologischen Untersuchungen wurde die ABC-Methode angewendet. Der Name leitet sich vom Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex ab. Bei dieser Methode bindet ein Biotin-gekoppelter Sekundärantikörper an den Primärantikörper. Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC). Zum Schluss werden die Schnitte mit dem Substrat inkubiert, welches von der Peroxidase in einen farbigen Niederschlag umgebaut wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit den Lungenschnitten immunhistochemische Färbungen für neutrophile Granulozyten (7/4; 1:80) durchgeführt.

3.5.3.1. Vorbereitung der Paraffinschnitte mittels Trypsin-Verdau

Aufgrund der Formalinfixierung kommt es zu Eiweißvernetzungen, die die Antigene maskieren können und somit für immunhistologische Untersuchungen unzugänglich machen. Aus diesem Grund müssen die Paraffinschnitte enzymatisch vorbehandelt werden.

Vor der enzymatischen Behandlung mit Trypsin wurden die Schnitte deparaffinisiert, rehydriert und mit endogener Peroxidase mit 0,3 % H_2O_2 blockiert. Nach dem Waschen mit ddH₂O und PBS erfolgte ein erneuter Blockierungsschritt mit Kasein (Vector Laboratories, Burlingame, USA) und 1 % Esel Serum. Die Schnitte wurden in PBS/ 0,01 % Triton-x 100 gewaschen.

3.5.3.2. ABC-Methode

Für die Färbung wurden die Schnitte als nächstes mit 0,25 % Trypsin bei 37°C 30 min inkubiert. Nach Abspülen dieser Lösung erfolgte die Färbung mit dem Primärantikörper (Verdünnung in PBS) für 2 h bei RT. Nach Spülen der Schnitte mit PBS erfolgte die Inkubation mit einem biotinylierten Sekundärantikörper (Verdünnung 1:100 in PBS) für 30 min bei RT. Für die Farbreaktion wurde nach erneutem Waschen mit PBS das Vector Standard Peroxidase ABC Kit (Vector Laboratories, Burlingame, USA) verwendet und für 30 min inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem Substrat 3'3'-Diaminobenzidin (DAB) für 2 min, was zu einer Braunfärbung des gesuchten Antigens führte.

3.5.3.3. Gegenfärbung mit Hämatoxylin

Nach spezifischer Markierung der Antigene ist es sinnvoll, die nicht spezifisch gefärbten Anteile des Gewebes in einer anderen Farbe gegenzufärben. So ist bei einer braunen Färbung (mit der ABC-Methode) der blaue Farbstoff Hämatoxylin als unspezifische Hintergrundfärbung geeignet, der insbesondere Kerne anfärbt.

Dafür wurden die Schnitte mit Meyers Hämatoxylin 1 min gegengefärbt, zunächst mit Wasser, dann mit PBS gewaschen, dehydriert und auf dem Objektträger fixiert.

3.6. Statistische Auswertung

Zur Analyse auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Messergebnissen der Versuchsgruppen wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney U-Test der Statistik-Software SPSS 15.0 (SPSS GmbH Software, München) zweiseitig durchgeführt. Als statistisch signifikant wurde Unterschiede bewertet, wenn $p < 0,05$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Alle p-Werte $> 0,05$ wurden als statistisch nicht signifikant bezeichnet.

In der vorliegenden Arbeit wird im Allgemeinen das arithmetische Mittel der jeweiligen Gruppe dargestellt mit dem Mittelwert des Standardfehlers (SEM) als Fehlerbalken. Zur Erstellung der Diagramme wurde die Software SigmaPlot 10.0 (Systat Software, Erkrath) verwendet.

4. ERGEBNISSE

4.1. Stabilität und Plastizität von T_H17-Zellen

Die ersten Nachweise für IL-17-produzierende CD4⁺ T-Zellen wurden bereits im Jahr 2001 publiziert [9], hingegen erfolgte die Bezeichnung „T_H17-Zellen“ als eigenständige Subpopulation erst 2005 [10, 11].

Zu diesem Zeitpunkt war allerdings wenig über die Stabilität und Plastizität dieser neu-definierten Zellpopulation bekannt. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit zunächst analysiert werden, ob die *in vitro* generierten T_H17-Zellen ihren Phänotyp behalten, d.h. IL-17 re-exprimieren oder unter definierten Kulturbedingungen in andere T-Zelllinien konvertieren können.

4.1.1. Stabilität und Plastizität von T_H17-Zellen *in vitro*

Für die Analyse der Stabilität *in vitro* wurden T_H17-Zellen - wie in Material und Methoden beschrieben – mit sogenannten *Bone Marrow-derived Dendritic Cells* (BMDCs) - generiert. Die Stimulation mit IL-6, TGF-β sowie anti-IL-4 und anti-IFN-γ (= T_H17-Bedingungen) führt zur Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen in T_H17-Zellen. Nach einer Woche wurden die CD4⁺ T-Zellen nach polyklonaler Restimulation für die Analyse im Durchflusszytometer intrazellulär auf IL-17 und IFN-γ gefärbt. Die verbleibenden Zellen wurden gewaschen und erneut mit BMDCs, anti-CD3 und T_H17-Bedingungen kultiviert. Nach der 2. Woche wurde analog verfahren.

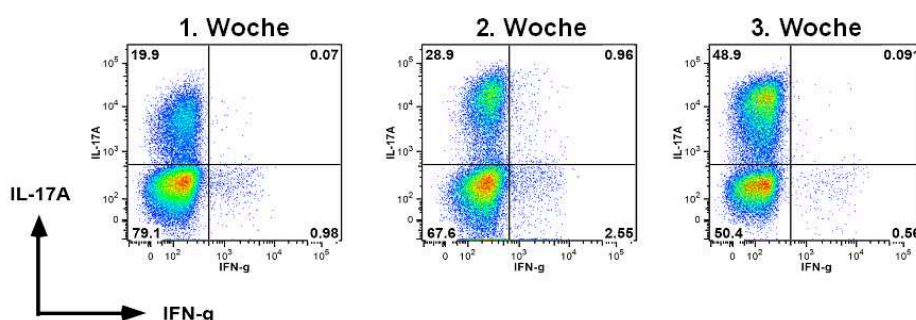


Abb. 6. *In vitro* generierte T_H17-Zellen sind stabil unter wiederholten T_H17-Bedingungen. Naive CD4⁺ T-Zellen ($2,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml) wurden zusammen mit BMDCs in einem Verhältnis von 10:1 und anti-CD3 in Kultur genommen. Für die Differenzierung von T_H17-Zellen wurden folgende polarisierende Zytokine und Antikörper dazugegeben: IL-6, TGF-β, anti-IFN-γ, anti-IL-4. Nach einer Woche wurden die Zellen polyklonal mit PMA und Ionomycin für 4 h restimuliert und auf CD4 sowie intrazellulär auf IL-17 und IFN-γ gefärbt. Die restlichen Zellen wurden wiederum mit BMDCs unter den oben genannten Bedingungen kultiviert. Nach der 2. Woche wurde analog verfahren. Dargestellt sind die Zytokine IL-17 und IFN-γ als *frequency of parent* bezogen auf CD4⁺ T-Zellen nach dem Ausschluss der toten Zellen. Repräsentativ sind die Daten eines Experiments dargestellt, es wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt.

Wie in Abb.6 zu sehen, kommt es zu einer Zunahme der Frequenz an IL-17 von der ersten (19,9 %) bis zur dritten Woche (48,9 %) der CD4⁺ T-Zellen. Innerhalb der CD4⁺ T-Zellen sind keine bzw. sehr wenig (2. Woche 2,55 % IFN-γ⁺) IFN-γ-Single- und IFN-γ/IL-17-Doppelproduzenten nachweisbar. Dieses Ergebnis belegt, dass die *in vitro* generierten T_H17-Zellen unter erneuten T_H17-polarisierenden Bedingungen stabil bleiben.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob *in vitro* generierte T_H17 -Zellen unter nicht- T_H17 -Bedingungen IL-17 re-exprimieren. Dafür wurden zunächst wieder naive $CD4^+$ T-Zellen *in vitro* zu T_H17 -Zellen differenziert. Nach einer Woche exprimierten 12,4 % der $CD4^+$ T-Zellen IL-17. Kultiviert man diese Zellen in der zweiten Woche unter T_H1 -Bedingungen (IL-12, anti-IL-4), ist keine IL-17-Produktion mehr zu beobachten. Hingegen beginnen die $CD4^+$ T-Zellen IFN- γ zu produzieren (13,3 %) (Abb.7 oben).

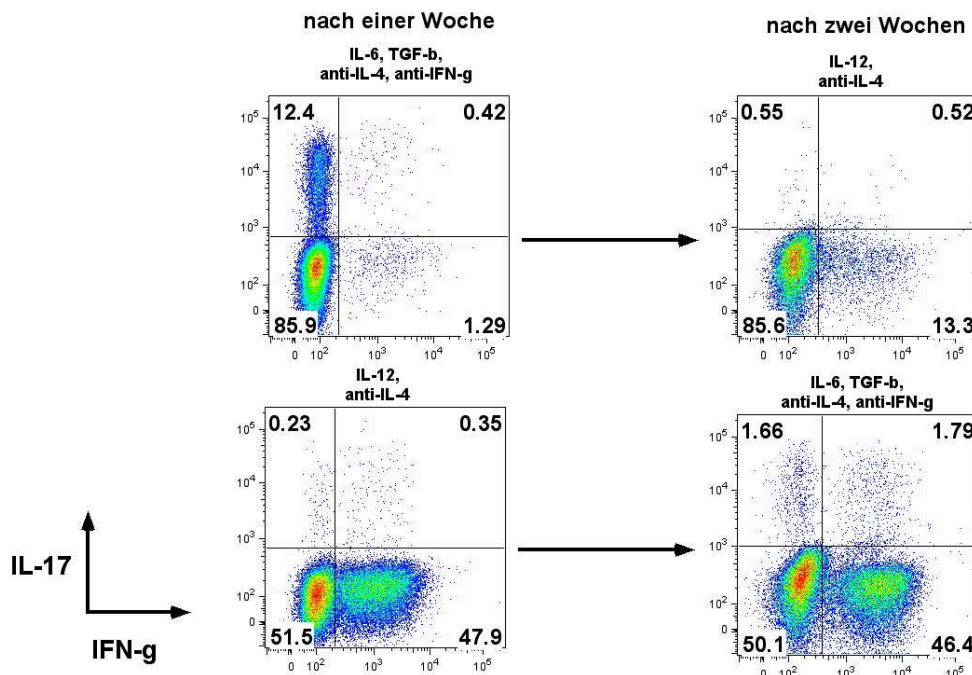


Abb. 7. *In vitro* generierte T_H17 -Zellen konvertieren zu T_H1 -Zellen unter T_H1 -polarisierenden Bedingungen.

Naive $CD4^+$ T-Zellen ($2,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml) wurden zusammen mit BMDCs in einem Verhältnis von 10:1 und anti-CD3 in Kultur genommen. Folgende polarisierende Antikörper und Zytokine wurden dazu gegeben: IL-6, TGF- β , anti-IFN- γ , anti-IL-4 (T_H17 -Bedingung) bzw. IL-12 und anti-IL-4 (T_H1 -Bedingung). Nach einer Woche wurden die Zellen polyklonal mit PMA und Ionomycin für 4 h restimuliert und auf CD4 sowie intrazellulär auf IL-17 und IFN- γ gefärbt. Die restlichen Zellen wurden wiederum mit BMDCs unter den oben genannten Bedingungen kultiviert. Dabei wurden die T_H17 -Zellen unter T_H1 -Bedingungen und die T_H1 -Zellen unter T_H17 -Bedingungen kultiviert. Nach der 2. Woche wurden die Zellen erneut durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die Frequenz der Zytokinproduzenten (*frequency of parent*) bezogen auf $CD4^+$ T-Zellen nach dem Ausschluss toter Zellen. Repräsentativ sind die Daten eines Experiments dargestellt, es wurden mindestens zwei unabhängige Experimente durchgeführt.

Neben der Generierung von T_H17 -Zellen wurden zusätzlich T_H1 -Zellen aus naiven T-Zellen generiert (Abb.7 unten links). Nach einer Woche sind 47,9 % der $CD4^+$ T-Zellen positiv für IFN- γ . Kultiviert man diese T_H1 -Zellen unter T_H17 -Bedingungen produzieren auch nach der zweiten Woche 46,4 % der $CD4^+$ T-Zellen IFN- γ (Abb.7 unten rechts). Das bedeutet, dass T_H1 -Zellen bereits nach der ersten Woche stabil sind und sich nicht durch die Zugabe von TGF- β , IL-6, anti-IL-4 und anti-IFN- γ in T_H17 -Zellen konvertieren lassen. Es kommt lediglich zu einer minimalen Zunahme der Frequenz an IL-17 von 0,23 % nach der ersten Woche auf 1,66 % in der zweiten Woche. Auch der Anteil an IL-17/IFN- γ -Doppelproduzenten nimmt mit 0,35 % von der ersten Woche auf 1,79 % nach der zweiten Woche nur geringfügig zu. Somit konnte hier gezeigt werden, dass *in vitro* generierte T_H17 -Zellen unter T_H1 -polarisierenden Bedingungen IL-17 nicht re-exprimieren, sondern in T_H1 -Zellen konvertieren. Hierbei ist ein entscheidender Faktor

anzumerken: Die als T_H17-Zellen bezeichnete Zellfraktion besteht nicht ausschließlich aus T_H17-Zellen. In der Zellkultur ist ein sehr hoher Anteil an Zellen enthalten, die weder IL-17 noch IFN- γ produzieren (85,9 % siehe Abb.7). Hinzu kommt ein kleiner Anteil an IFN- γ -produzierenden CD4⁺ T-Zellen (1,29 %). Um die Stabilität der T_H17-Zellen genauer zu charakterisieren, müssten diese Zellen sortiert werden, um ausschließlich IL-17-produzierende CD4⁺ T-Zellen unter definierten Bedingungen weiter zu kultivieren. Mithilfe des anti-Maus IL-17 *Cytokine Secretion Assays* (CSA) ist es möglich vitale IL-17-produzierende Zellen zu detektieren und zu sortieren. Das Prinzip des CSA beruht auf der Verwendung von Antikörper-Dimeren. Die Spezifität des einen Antikörpers ist gegen CD45 gerichtet, welches auf der Oberfläche von Leukozyten exprimiert wird. Der zweite Antikörper erkennt IL-17. Somit steht ein System zur Verfügung, das die Oberflächenmarkierung von Zellen mit IL-17 und damit ihre gezielte Sortierung erlaubt. Dieser von Miltenyi Biotec entwickelte CSA wurde hier verwendet. Dabei wurden die *in vitro* Analysen zur Stabilität und Plastizität von Maria Lexberg (AG Zellbiologie, DRFZ) durchgeführt [190].

4.1.2. Stabilität und Plastizität von T_H17-Zellen *ex vivo*

Neben den *in vitro*-Analysen ist die Frage nach der Stabilität von T_H17-Zellen *in vivo* aufgrund ihres proinflammatorischen Potentials von großer Bedeutung. Dafür wurde die gewünschte Zellpopulation mithilfe des IL-17 CSA aus Mäusen mit induzierten Autoimmunerkrankungen sortiert und *in vitro* unter definierten Bedingungen kultiviert.

Für die Sortierung der IL-17-produzierenden CD4⁺ T-Zellen *ex vivo* wurden das Mausmodell der Multiplen Sklerose – die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) – sowie die G6PI-induzierte Arthritis als repräsentative Beispiele für Autoimmunerkrankungen ausgewählt. In beiden Autoimmunmodellen konnte die Beteiligung von T_H17-Zellen am Entzündungsprozess nachgewiesen werden [191]. Die Analyse der Stabilität der T_H17-Zellen aus den Autoimmunmodellen ist in den folgenden Abschnitten näher beschrieben.

4.1.2.1. Stabilität und Plastizität von T_H17-Zellen *ex vivo* G6PI-immunisierter Mäuse

Die G6PI-induzierte Arthritis ist in der Arbeitsgruppe von Prof. Kamradt ein sehr gut untersuchtes Autoimmunmodell [192-195]. Für den Zeitpunkt der Sortierung von T_H17-Zellen aus der Milz konnte somit auf bereits durchgeführte Zytokinanalysen zurückgegriffen werden. Die maximale Zytokinproduktion – insbesondere IL-17 – ist am Tag 9 nach G6PI-Immunisierung von DBA/1 Mäusen in der Milz zu finden [193]. Zu diesem Zeitpunkt zeigen die Mäuse noch keine klinischen Symptome in Form von Rötung bzw. Schwellung der Gelenke. Die maximale Zytokinproduktion in den sekundär lymphatischen Organen korreliert damit nicht mit den klinischen Anzeichen der Arthritis. Anhand dieser Daten wurden am Tag 9 nach G6PI-Immunisierung von DBA/1 Mäusen die Splenozyten mit PMA und Ionomycin für 2, 3, 4 und 5 h restimuliert (Abb.8).

Dieses Experiment sollte zeigen, welche Frequenz an T_H17-Zellen nach den unterschiedlichen Restimulationszeiten zu erwarten ist. Wie in Abb.8 zu sehen ist, gibt es eine positive Korrelation zwischen der IL-17-Frequenz und der Restimulationszeit. Die Frequenz an IFN- γ - und IL-17-produzierenden CD4⁺ T-Zellen ist nach 5 h polyklonaler Restimulation am höchsten (2,96 % IL-17 und 8,6 % IFN- γ). Auch IFN- γ /IL-17-CD4⁺-Doppelproduzenten sind mit 1,73 % am Tag 9 nach G6PI-Immunisierung in der Milz nachzuweisen.

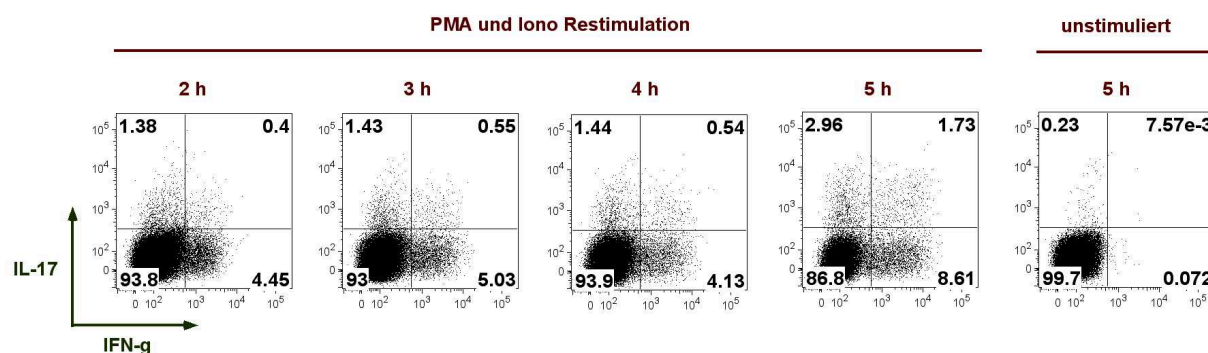


Abb. 8. Unterschiedliche Restimulationszeiten mit PMA und Ionomycin und deren Auswirkung auf die IL-17-Produktion. Am Tag 9 nach Immunisierung von DBA/1 Mäusen mit G6PI in CFA wurden die Splenozyten mit PMA und Ionomycin restimuliert. 1 h vor Ende der Restimulationszeit wurde Brefeldin A zu den Zellen gegeben. Nach 2, 3, 4 und 5 h wurden die Zellen entnommen und nach der intrazellulären Färbung im Durchflusszytometer analysiert. In den Dotplots ist IL-17 gegen IFN-γ als *frequency of parent* (bezogen auf die CD4⁺ T-Zellen) gezeigt. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen.

Für die Durchführung des IL-17 CSAs wurde allerdings eine Restimulationszeit von 2 h mit PMA und Ionomycin gewählt. Eine zu lange Inkubation mit den genannten starken Stimuli könnte die Zellen schädigen und den Anteil der toten Zellen vervielfachen.

Für die Sortierung der T_H17-Zellen *ex vivo* G6PI-immunisierter Mäuse wurden die Milzen am Tag 9 entnommen und eine Einzelzellsuspension hergestellt. Nach Sortierung der CD4⁺ T-Zellen mittels AutoMACS® Separator wurden die Zellen für den CSA 2 h polyklonal restimuliert. Ein Teil der Zellen wurden zusätzlich in Anwesenheit von Brefeldin A stimuliert, um im Anschluss eine intrazelluläre Zytokinfärbung als Kontrolle durchzuführen (Abb.9).

Nach polyklonaler Restimulation wurden die Zellen in einem Sekretionsschritt mit der IL-17-Fangmatrix inkubiert. Für die Sortierung am FACS Aria wurden die Zellen mit CD4, CD62L und dem IL-17-Detektions-Antikörper markiert. L-Selektin (= CD62L) ist ein Zelladhensionsmolekül und wird auf Leukozyten exprimiert. Während CD62L auf naiven CD4⁺ T-Zellen zu finden ist, wird dieses Adhensionsmolekül nicht auf aktivierten T-Zellen exprimiert. Folgende Zellpopulationen wurden sortiert: CD4⁺CD62L⁻IL-17⁺ Zellen und CD4⁺CD62L⁻IL-17⁻ Zellen (Abb.10, detaillierte Beschreibung der *Gating* Strategie siehe Material und Methoden 3.2.7. Sortierung von Zytokin-produzierenden Zellen mittels *Cytokine Secretion Assay* im FACS Aria). In zwei separaten Experimenten wurden dabei aus jeweils 8 Milzen G6PI-immunisierter DBA/1 Mäuse 45.000 bzw. 20.000 IL-17-produzierende CD4⁺ T-Zellen isoliert (Tab.11). Von der positiven und negativen Zellfraktion wurde zusätzlich eine Re-analyse durchgeführt, um die Reinheit der sortierten Zellen zu kontrollieren. Im Experiment 1 betrug die Reinheit der gewünschten Zellpopulation 96,3 % (Abb.10).

Tab. 11. Ausbeute und Reinheit der aus den Milzen G6PI-immunisierter Mäuse isolierten T_H17-Zellen. In zwei separaten Experimenten wurden je 8 DBA/1 Mäuse mit G6PI in CFA immunisiert. Am Tag 9 nach Immunisierung wurden aus den Milzen die T_H17-Zellen mittels IL-17 CSA isoliert.

Experiment #	Ausbeute an CD4 ⁺ CD62L ⁺ IL-17 ⁺ Zellen	Reinheit
1	45.000	96,3 %
2	20.000	*

* Re-analyse wurde aufgrund der sehr geringen Ausbeute an Zellen nicht durchgeführt.

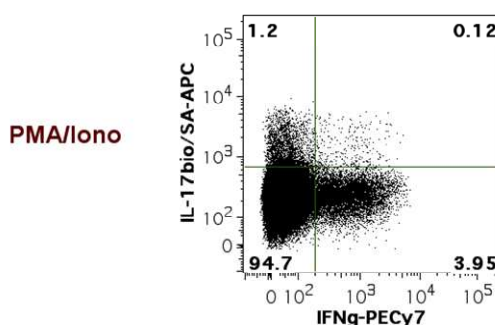


Abb. 9. Intrazelluläre Färbung als Kontrolle für den IL-17 CSA. Am Tag 9 nach Immunisierung von 8 DBA/1 mit G6PI in CFA wurden die Splenozyten für die intrazelluläre Färbung mit PMA und Ionomycin 2 h restimuliert. Dargestellt ist die *frequency of parent* (bezogen auf CD4⁺) der IL-17- und IFN-γ-Produktion.

Die intrazelluläre Kontrollfärbung in Abb.9 zeigt, dass 1,34 % der CD4⁺ T-Zellen IL-17, 4,07 % IFN-γ und 0,12 % sowohl IL-17 als auch IFN-γ produzieren.

T_H17-Zellen, isoliert aus den sekundär lymphatischen Organen G6PI-immunisierter Mäusen, wurden zunächst mit Kulturmedium gewaschen und auf eine Zellkonzentration von 15.000 Zellen/ 100 µl (Experiment 1) bzw. 10.000 Zellen/ 100 µl (Experiment 2) eingestellt. Die Zellen wurden dann auf *wells* einer 96 *well* Platte verteilt (100 µl pro *well*), welche zuvor über Nacht im Inkubator mit anti-CD3 (3 µg/ml) beschichtet wurde. Neben anti-CD28 wurden polarisierende Antikörper und Zytokine zu den Zellen gegeben, um diese unter T-Zell-spezifischen Bedingungen zu kultivieren. Folgende Bedingungen wurden für die *in vitro* Kultivierung ausgewählt: T_H17-Bedingung (TGF-β, IL-6, anti-IL-4 und anti-IFN-γ); T_H1-Bedingung (anti-IL-4 und IL-12) und T_H2-Bedingung (anti-IFN-γ und IL-4). Zusätzlich erfolgte die Kultivierung der sortierten Zellen ausschließlich mit IL-23. Nach 6 Tagen wurde die Zytokinproduktion (IL-17, IL-22, IFN-γ und IL-4) der Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abb.11).

In Abb.11 ist die Zytokinproduktion der sortierten T_H17-Zellen, als *frequency of parent* angegeben, am Tag 6 *in vitro* zu sehen. Abb.11 A und B zeigen zwei verschiedene Experimente – Experiment 1 und Experiment 2 (bezogen auf Tab.11). Im Experiment 2 konnten aufgrund der geringen Ausbeute an T_H17-Zellen lediglich zwei verschiedene *in vitro* Kulturbedingungen gewählt werden. In den zwei unabhängigen Experimenten ist zu erkennen, dass unter T_H17-Bedingungen ca. 40 bis 50 % der sortierten Zellen IL-17 re-exprimieren. In Experiment 1 sind über 50 % der CD4⁺ T-Zellen IL-17-positiv, wobei 7,75 % IL-17 und IFN-γ bzw. 14,5 % IL-17 und IL-22 produzieren. Ähnliche Frequenzen ergeben sich in Experiment 2 unter den gewählten Bedingungen: ca. 45 % der CD4⁺ T-Zellen sind IL-17-positiv, während 5,81 % IL-17 und IFN-γ bzw. 10,4 % IL-17 und IL-22 produzieren können. Die Zugabe von IL-23 hat keine stabilisierende

Wirkung auf die IL-17-Produktion. Die T_H17 -Zellen re-exprimieren lediglich 18,3 % IL-17 nach Stimulation mit IL-23.

T_H1 - und T_H2 -Bedingungen hingegen führen in den T_H17 -Zellen zu einer stark reduzierten Produktion von IL-17 und unter T_H1 -Bedingung zu einer Zunahme an IFN- γ (49,6 %). Somit sind die T_H17 -Zellen *ex vivo* G6PI-immunisierter Mäuse nicht stabil und können unter T_H1 -Bedingungen in IFN- γ -produzierende $CD4^+$ T-Zellen konvertieren. Dabei verlieren die Zellen ihre Fähigkeit IL-17 zu exprimieren. T_H2 -Bedingungen hingegen führen nicht zur Expression von IL-4 in den T_H17 -Zellen.

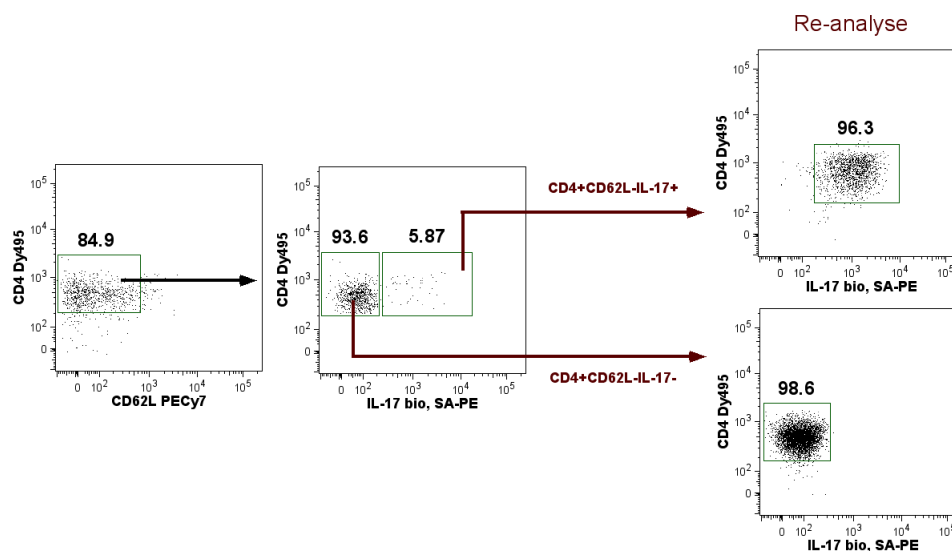


Abb. 10. Gating Strategie zur Sortierung der $CD4^+CD62L^-IL-17^+$ T-Zellen mittels FACSria und Re-analyse der IL-17-positiven bzw.-negativen Population. Am Tag 9 nach Immunisierung von DBA/1 Mäusen mit G6PI wurden Splenozyten für die Sortierung der IL-17-produzierenden Zellen polykonal restimuliert. Nach Auswahl der Lymphozyten im FSC/SSC und dem Ausschluss der toten Zellen mit Propidium-Iodid (PI), erfolgte die Eingrenzung der $CD4^+CD62L^-$ Zellen. Sortiert wurden die $CD4^+CD62L^-IL-17^-$ und $CD4^+CD62L^-IL-17^+$ Zellen. Die Re-analyse zeigt eine Reinheit von 96,3 % der $IL-17^+$ und 98,65 % der $IL-17^-$ Fraktion.

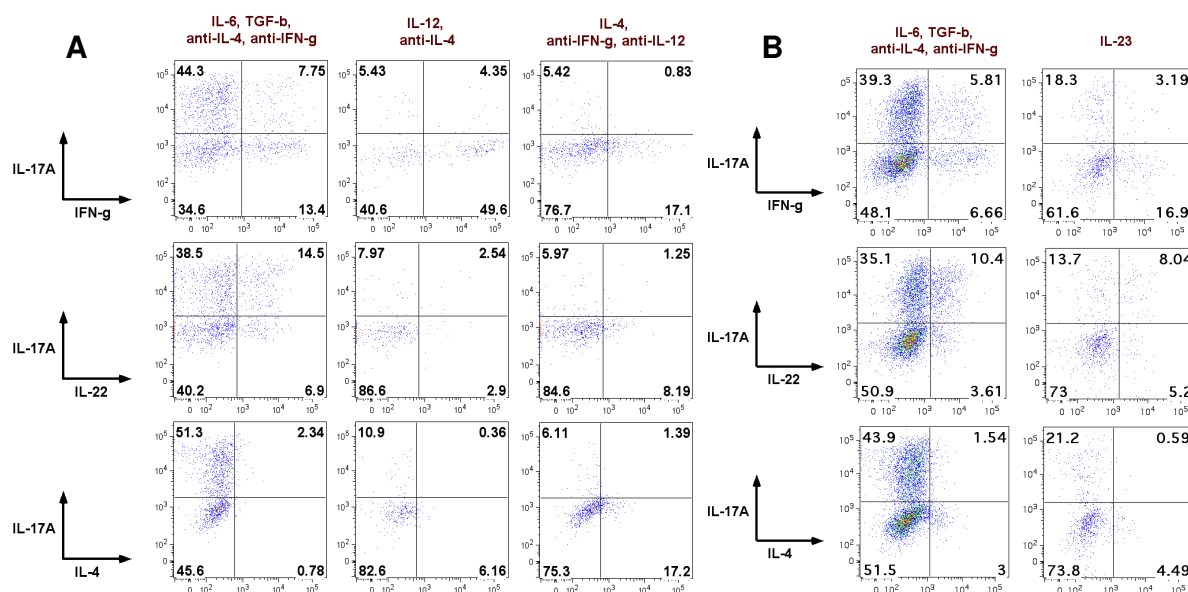


Abb. 11. Zytokinexpression der T_H17 -Zellen *ex vivo* G6PI-immunisierter Mäuse nach 6 Tagen unter definierten Kulturbedingungen. IL-17⁺ CD4⁺ T-Zellen, isoliert aus den Milzen G6PI-immunisierter DBA/1 Mäuse am Tag 9, wurden *in vitro* mit anti-CD3/anti-CD28 und unter T_H17 -, T_H1 - und T_H2 -Bedingungen bzw. ausschließlich mit IL-23 kultiviert. Die Zellen wurden am Tag 6 mit PMA und Ionomycin restimuliert und intrazellulär gefärbt. Dargestellt ist die Zytokinproduktion (IL-17, IFN-γ, IL-22, IL-4) als *frequency of parent* (bezogen auf CD4⁺ T-Zellen) nach dem Ausschluss der toten Zellen. A und B zeigen zwei verschiedene Experimente, bezogen auf Tab.11.

4.1.2.2. Stabilität und Plastizität von T_H17 -Zellen *ex vivo* MOG₃₅₋₅₅-immunisierter Mäuse

Für die Analyse der Stabilität und Plastizität von T_H17 -Zellen *ex vivo* wurde neben der G6PI-induzierten Arthritis ein weiteres Autoimmunmodell verwendet – die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE). Auch dieses Mausmodell ist in der Arbeitsgruppe von Prof. Kamradt sehr gut etabliert und Fokus der Forschung [68].

Für die Sortierung der gewünschten Zellen in diesem System wurden verschiedene Analysezeitpunkte (Induktions- und Effektorphase) ausgewählt (Abb.12). Die Immunisierung mit dem Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG₃₅₋₅₅) Peptid führt nach einer Induktionsphase zur Ausbildung spezifischer Symptome wie Lähmung des Schwanzes und der Extremitäten, welche je nach Schweregrad anhand eines klinischen Scores (Bewertung der EAE-Symptome anhand des klinischen Scores siehe 3.4.2. Induktion einer Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE)) bewertet werden (Abb.12). Die Effektorphase ist neben den klinischen Symptomen charakteristisch für die Migration inflammatorischer Zellen in das Zentralnervensystem (ZNS), während in der Induktionsphase diese Zytokin-produzierenden Zellen in den sekundär lymphatischen Organen wie Milz und drainierende Lymphknoten zu finden sind.

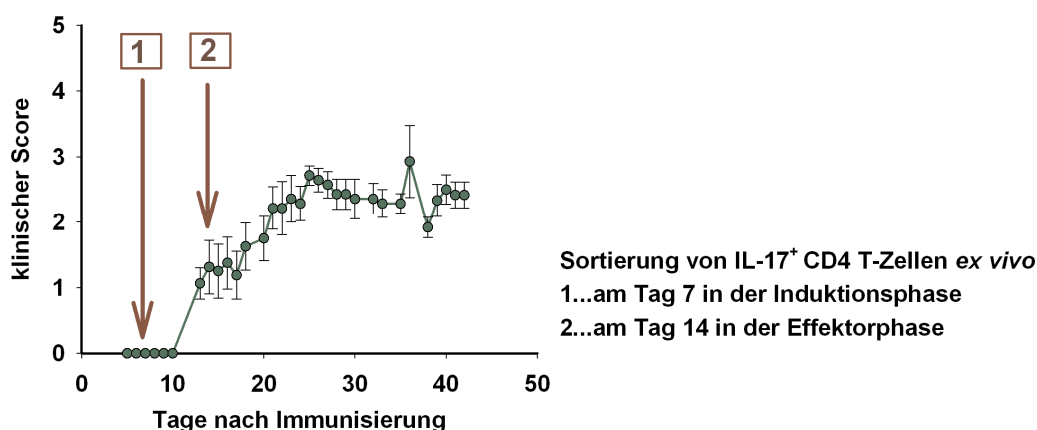


Abb. 12. Klinischer Verlauf der EAE in C57BL/6 Mäusen. Zur Analyse der T_H17-Zellen wurden diese am Tag 7, in der Induktionsphase aus der Milz (1) und am Tag 14, in der Effektorphase aus dem ZNS (2), nach Immunisierung sortiert. Für die Induktion der EAE wurden C57BL/6 Mäuse mit 200 µg MOG₃₅₋₅₅ in CFA immunisiert. Zusätzlich wurde den Tieren 200 ng Pertussistoxin am Tag 0 und 2 i.p. appliziert. Die Mäuse wurden täglich begutachtet und anhand eines klinischen Scores wie folgt bewertet: Score 0 = keine Symptome, 1 = Schwanzparalyse, 2 = paralyzierter Schwanz und Motilitätsbeeinträchtigungen, 3 = Paralyse von Schwanz und Hinterbeinen, 4 = Tetraplegie, 5 = moribund oder tot.

Um die Konvertierbarkeit von *in vivo* differenzierten T_H17-Zellen in T_H1- oder T_H2-Zellen zu untersuchen, wurden die sortierten Zellen *in vitro* unter definierten und polarisierenden Bedingungen 7 Tage kultiviert werden – analog zu Abschnitt 4.1.2.1 Stabilität und Plastizität von T_H17-Zellen *ex vivo* G6PI-immunisierter Mäuse.

Um ausschließlich Antigen-spezifische T_H17-Zellen zu sortieren, müssen die Zellen mit einem spezifischen Antigen, dem MOG₃₅₋₅₅ Peptid, restimuliert werden. Dazu wurden in einem Vorexperiment die optimalen Restimulationsbedingungen ermittelt (Abb.13). C57BL/6 Mäuse wurden mit MOG₃₅₋₅₅ in CFA am Tag 0 immunisiert. Nach 7 Tagen wurden die Zellen aus der Milz polyklonal mit PMA und Ionomycin sowie Antigen-spezifisch mit MOG₃₅₋₅₅ (in An- und Abwesenheit von anti-CD28) restimuliert. Die zusätzliche Inkubation mit anti-CD28 besitzt Einfluss auf die Kostimulation der Zellen und verstärkt somit die Aktivierung der Zellen. Eine Stunde vor Probenentnahme erfolgte die Zugabe von Brefeldin A zu den Zellen. Nach 1, 2, 3 und 4 h wurden Zellen für die Analyse im Durchflusszytometer entnommen und auf CD4, IL-17 und IFN-γ gefärbt. Die höchste Frequenz an IL-17-produzierenden CD4⁺ T-Zellen wurde nach polyklonaler Restimulation erreicht. Zwischen der Zytokinproduktion und der Restimulationszeit ist eine positive Korrelation zu verzeichnen. Somit produzieren nach 4 h polyklonaler Stimulation 5,47 % der CD4⁺ T-Zellen IL-17, während nach Restimulation mit MOG₃₅₋₅₅ lediglich 0,68 % IL-17⁺ CD4⁺ T-Zellen detektiert werden konnten. Die Zugabe von anti-CD28 als Kostimulation in der MOG-stimulierten Probe erhöht nicht die Zytokinproduktion.

Aufgrund des langen Sortiervorganges und dem damit verbundenen Stress für die Zellen ist es wichtig die Restimulationszeit so kurz wie möglich zu wählen. Demzufolge wurde für die Sortierung der T_H17-Zellen die gleichen Restimulationsbedingungen gewählt wie für T_H17-Zellen *ex vivo* G6PI-immunisierter Mäuse. Somit sind die Daten aus dem EAE-Modell vergleichbar mit denen aus dem G6PI-Arthritismodell.

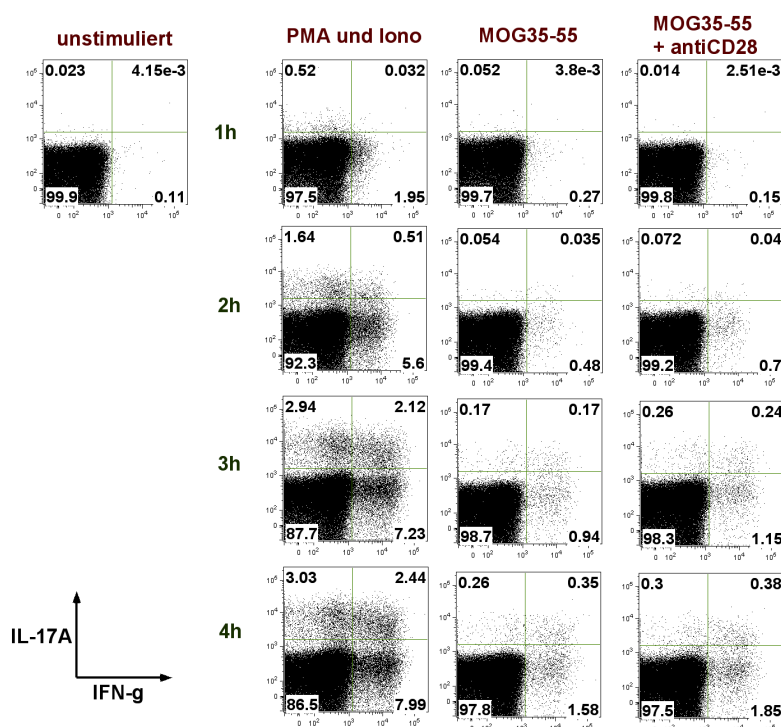


Abb. 13. Restimulationsbedingungen für die Sortierung von T_H17 -Zellen *ex vivo* MOG₃₅₋₅₅-immunisierter Mäuse am Tag 7. Nach Immunisierung von C57BL/6 mit 200 μ g MOG₃₅₋₅₅ in CFA immunisiert wurden die Milzen am Tag 7 entnommen. Die Splenozyten wurden auf eine Zellkonzentration von $0,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt und polyklonal mit PMA/Ionomycin bzw. Antigen-spezifisch mit MOG₃₅₋₅₅ (mit bzw. ohne anti-CD28) für 1, 2, 3 oder 4 h restimuliert. Jeweils 1 h vor Probenentnahme wurde Brefeldin A zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden anschließend auf CD4, IL-17 und IFN- γ gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Nach Ausschluss toter Zellen wurden die vitalen CD4⁺ T-Zellen eingegrenzt und die Zytokine IL-17 gegen IFN- γ im Dotplot als *frequency of parent* dargestellt.

4.1.2.2.1. Stabilität und Plastizität von T_H17 -Zellen isoliert aus MOG₃₅₋₅₅-immunisierten Mäusen in der Induktionsphase

Für die Analyse der T_H17 -Zellen aus der Induktionsphase wurden die Milzen der C57BL/6 Mäuse am Tag 7 nach Immunisierung entnommen. Für den IL-17 CSA erfolgte die polyklonale Restimulation der Splenozyten für 2 h. Parallel dazu wurden Zellen für die intrazelluläre Färbung stimuliert, d.h. in Anwesenheit von PMA und Ionomycin sowie Brefeldin A (Abb.14). Im Gegensatz zu der unstimulierten Probe produzieren die CD4⁺ T-Zellen nach Inkubation mit PMA und Ionomycin 1,44 % IL-17, 4,42 % IFN- γ und 0,21 % sowohl IL-17 als auch IFN- γ .

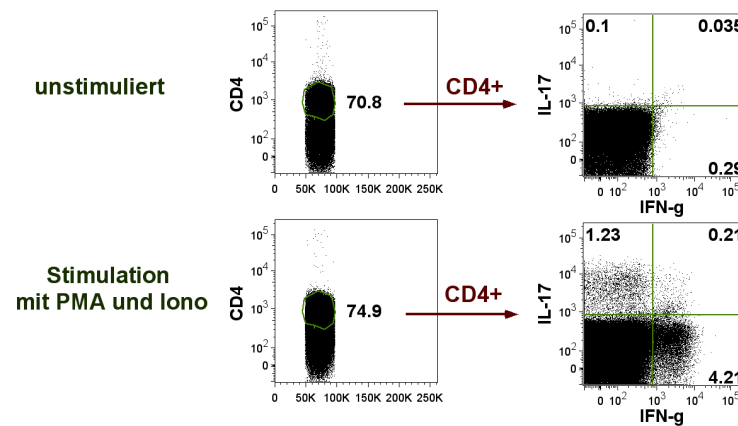


Abb. 14. Intrazelluläre Zytokinfärbung der Splenozyten am Tag 7 nach MOG₃₅₋₅₅-Immunisierung. In C57BL/6 Mäusen wurde eine EAE ausgelöst. Am Tag 7 nach Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅ wurde aus den Milzen eine Einzelzellsuspension hergestellt und Zellen für die intrazelluläre Zytokinfärbung mit PMA/Ionomycin und Brefeldin A für 2 h restimuliert. Die Zytokine IL-17 gegen IFN- γ sind im Dotplot als *frequency of parent* (bezogen auf CD4⁺ T-Zellen) dargestellt.

Die Isolation der T_H17-Zellen aus MOG₃₅₋₅₅-immunisierten Mäusen erfolgte analog dem Sortiervorgang der Zellen aus G6PI-immunisierten Mäuse. Die Reinheit der T_H17-Zellen nach dem Sortieren mittels FACSARIA betrug dabei zwischen 97,8 und 99,9 %. Die Ausbeute an T_H17-Zellen sowie deren Reinheiten in den fünf separaten Experimenten ist in Tab.12 zusammengefasst. Diese Zellen wurden auf *wells* einer Zellkulturplatte aufgeteilt und unter unterschiedlichen Bedingungen 6 Tage zusammen mit bestrahlten Antigenpräsentierenden Zellen (APCs) in einem Verhältnis von 10:1 kultiviert. Als Antigen wurde MOG₃₅₋₅₅ verwendet. Folgende Bedingungen wurden für die Kultivierung ausgewählt: TGF- β , IL-6, anti-IL-4 und anti-IFN- γ (T_H17); IL-12 und anti-IL-4 (T_H1); IL-4 und anti-IFN- γ (T_H2) sowie ohne polarisierende AK oder Zytokine, was als T_H0-Bedingung (neutral) bezeichnet wird. Nach 7 Tagen erfolgte die Zytokinanalyse. Dabei wurden die Zellen auf CD4 sowie die T-Zellsubtyp-spezifischen Zytokine IL-17, IFN- γ und IL-4 gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert.

Tab. 12. Ausbeute und Reinheit der T_H17-Zellen aus den Milzen MOG₃₅₋₅₅-immunisierter Mäuse am Tag 7. In fünf separaten Experimenten wurde in C57BL/6 Mäusen eine EAE ausgelöst. Am Tag 7 nach Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅ in CFA wurde aus den Milzen die T_H17-Zellen mithilfe des IL-17 CSA isoliert. Nach der Sortierung erfolgte die Re-analyse, um die Reinheit (in %) der Population zu bestimmen.

Experiment #	Anzahl Mäuse	Ausbeute an CD4 ⁺ CD62L ⁺ IL-17 ⁺ Zellen	Reinheit
1	10	277.800	98,6 %
2	10	106.000	98,9 %
3	10	505.000	97,8 %
4	10	305.000	99,9 %
5	12	800.000	99,9 %

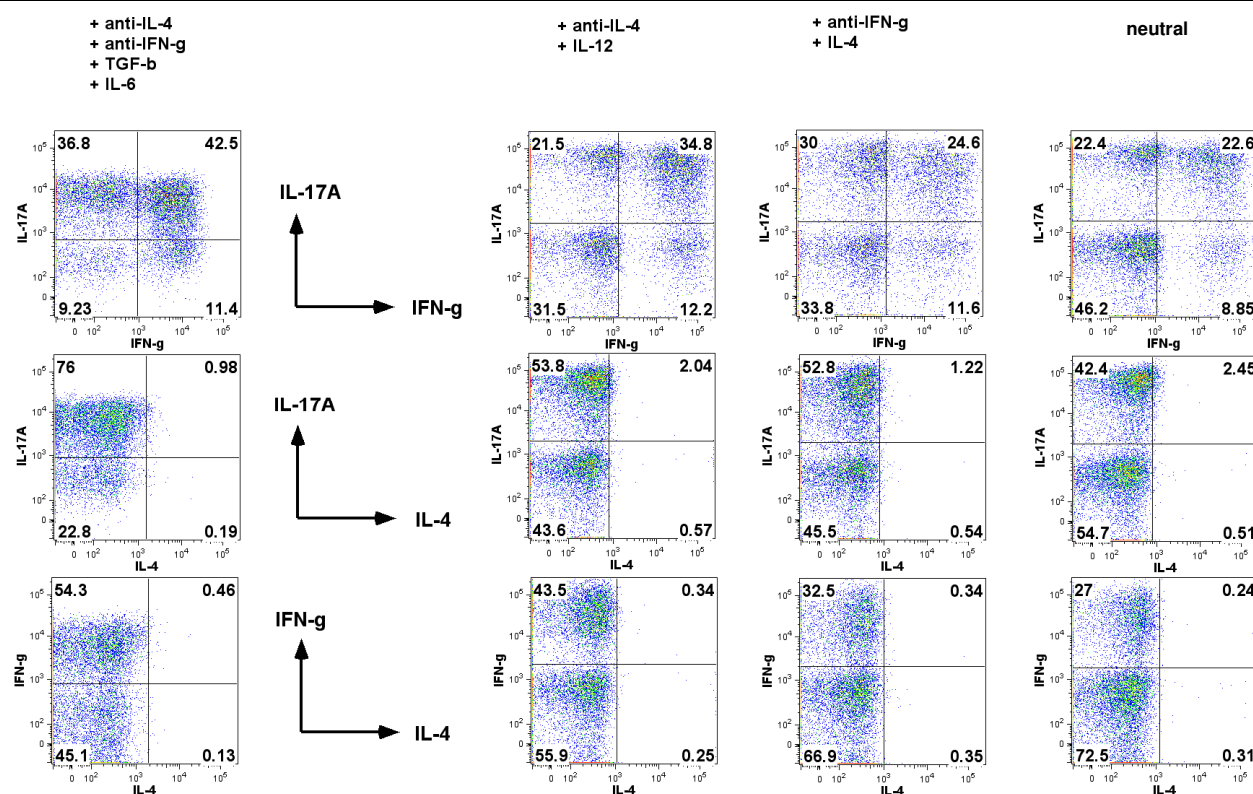


Abb. 15. Zytokinexpression der T_H17 -Zellen *ex vivo* MOG₃₅₋₅₅-immunisierter Mäuse in der Induktionsphase nach definierten Kulturbedingungen. In C57BL/6 Mäusen wurde eine EAE induziert. Am Tag 7 nach Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅ in CFA wurde aus den Milzen eine Einzelzellsuspension hergestellt und die Zellen für den IL-17 CSA mit PMA/Ionomycin für 2 h restimuliert. Nach Sortierung der T_H17 -Zellen wurden diese Zellen zusammen mit bestrahlten APCs und unter unterschiedlichen Polarisierungsbedingungen kultiviert (T_H17 -Bedingung: IL-6, TGF- β , anti-IL-4, anti-IFN- γ ; T_H1 -Bedingung: IL-12, anti-IL-4; T_H0 -Bedingung: ohne polarisierende Zytokine bzw. Antikörper). Am Tag 6 *in vitro* erfolgte die Restimulation und das Zytokinprofil wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dabei wurden zunächst tote Zellen mit ViD markiert. Die Färbung der vitalen Zellen erfolgte auf CD4 sowie die Zytokine IL-17, IFN- γ und IL-4. In den Dotplots sind die jeweiligen Zytokine als *frequency of parent*, bezogen auf $CD4^+$ T-Zellen, gegeneinander dargestellt zu sehen. Repräsentativ sind die Daten eines Experiments dargestellt, es wurden mindestens fünf unabhängige Experimente durchgeführt.

Die Zytokinanalysen in Abb.15 zeigen, dass die T_H17 -Zellen, isoliert aus Milzen in der Induktionsphase der EAE, nach 6 Tagen *in vitro* weniger IL-17 produzieren – unabhängig der polarisierenden Antikörper und Zytokine. Dabei produzieren allerdings etwa die Hälfte der $IL-17^+$ $CD4^+$ T-Zellen zusätzlich IFN- γ . Somit exprimieren z.B. unter T_H17 -Bedingungen über 75 % der $CD4^+$ T-Zellen IL-17, während 42,5 % davon zusätzlich IFN- γ produzieren können. Ein ähnliches Verhältnis wurde auch unter T_H1 -, T_H2 - und T_H0 -Bedingungen beobachtet. Unabhängig der Polarisierungsbedingungen konvertieren etwa 10 % der sortierten T_H17 -Zellen zu IFN- γ -Singleproduzenten. IL-4 als charakteristisches T_H2 -Zytokin wird von den isolierten T_H17 -Zellen unter den definierten Bedingungen nicht produziert – auch nicht unter T_H2 -spezifischen Bedingungen (IL-4, anti-IFN- γ).

Neben der Zytokinanalyse wurden die Zellen auf die Expression von Transkriptionsfaktoren auf mRNA-Ebene untersucht (Abb.16). Die RT-PCR wurde freundlicherweise von Maria Lexberg (AG Zellbiologie, DRFZ, Berlin) durchgeführt. Die Zytokindaten korrelieren mit den in der RT-PCR gemessenen T-Zell-

spezifischen Transkriptionsfaktoren. Dabei wurden die T_H17 -spezifischen Transkriptionsfaktoren $ROR\gamma_t$ und $ROR\alpha$, sowie die für T_H1 - und T_H2 -Zellen beschriebenen Faktoren, T-bet und GATA-3 analysiert (Abb.16).

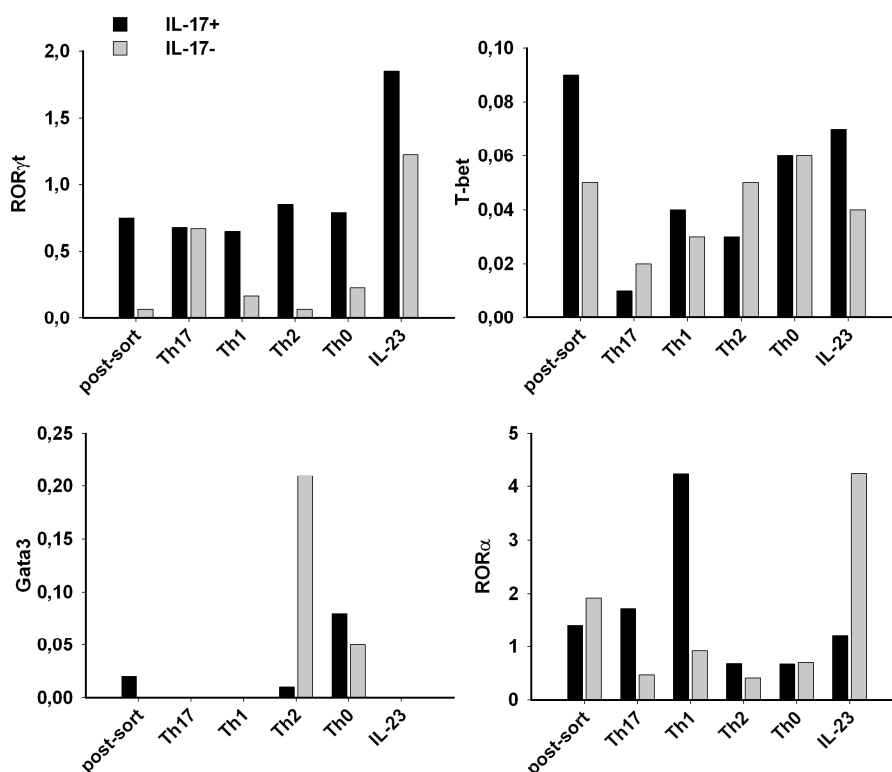


Abb. 16. Relative mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren in T_H17 -Zellen isoliert aus MOG₃₅₋₅₅-immunisierten Mäusen in der Induktionsphase nach definierten Kulturbedingungen. Am Tag 7 nach Immunisierung von 10 C57BL/6 Mäusen mit MOG₃₅₋₅₅ wurde aus den Milzen eine Einzelzellsuspension hergestellt und Zellen für den IL-17 CSA mit PMA/Ionomycin für 2 h restimuliert. Nach Sortierung der IL-17⁺ (schwarz) und IL-17⁻ (grau) CD4⁺ T-Zellen wurden diese Zellen zusammen mit bestrahlten APCs und unter unterschiedlichen Polarisierungsbedingungen kultiviert (T_H17 -Bedingung: IL-6, TGF- β , anti-IL-4, anti-IFN- γ ; T_H1 -Bedingung: IL-12, anti-IL-4; T_H0 -Bedingung: ohne polarisierende Zytokine bzw. Antikörper). Am Tag 6 *in vitro* erfolgte die Restimulation mit PMA und Ionomycin. Sowohl direkt nach der Sortierung (= post-sort) als auch am Tag 6 *in vitro* wurden die Zellen für den Nachweis der Transkriptionsfaktoren mittels RT-PCR analysiert. Dargestellt ist die relative Expression der Transkriptionsfaktoren $ROR\gamma_t$, $ROR\alpha$, GATA-3 und T-bet, normalisiert auf das *housekeeping* Gen Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT). Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

Die sortierten IL-17-positiven CD4⁺ T-Zellen exprimieren auf mRNA-Ebene sowohl $ROR\gamma_t$ und $ROR\alpha$ als auch den T_H1 -spezifischen Transkriptionsfaktor T-bet. Das Expressionsniveau von $ROR\gamma_t$ bleibt auch nach 6 Tagen *in vitro* unter unterschiedlichen Bedingungen konstant. Dagegen verdoppelt IL-23 *in vitro* das Expressionsniveau der $ROR\gamma_t$ mRNA in der IL-17-positiven Zellpopulation. Hingegen wird die mRNA von T-bet in den IL-17-positiven CD4⁺ T-Zellen unter T_H17 -Bedingungen, aber auch unter T_H1 - und T_H2 -Bedingungen, *in vitro* herunter reguliert. Der Transkriptionsfaktor $ROR\alpha$ wird lediglich nach Stimulation mit IL-12 und anti-IL-4 (T_H1 -Bedingungen) in der IL-17-positiven Fraktion hochreguliert.

Die nach der Sortierung IL-17-negative Fraktion nach der Sortierung exprimiert wenig ROR γ t. Nach Kultivierung der Zellen unter T_H17-Bedingungen, als auch durch die Stimulation mit IL-23, wird ROR γ t verstärkt exprimiert. Zusätzlich wird durch die Stimulation mit IL-23 ROR α in der IL-17-negativen Fraktion heraufreguliert. T-bet hingegen wird sowohl unmittelbar nach der Sortierung von den IL-17-negativen Zellen, als auch nach 6 Tagen *in vitro* von diesen Zellen exprimiert.

GATA-3 wird weder von der IL-17-positiven noch IL-17-negativen Fraktion nach der Sortierung exprimiert. Die Stimulation der IL-17-negativen Zellen mit IL-4 und anti-IFN- γ (T_H2-Bedingung) führt zur Expression von GATA-3. Auch unter neutralen Bedingungen ist GATA-3 in den IL-17-positiven bzw. -negativen CD4⁺ T-Zellen nachzuweisen.

Die Daten zeigen, dass T_H17-Zellen aus der Induktionsphase EAE-erkrankter Mäuse *in vitro* zu T_H1/T_H17-Zellen konvertieren. Unabhängig der Stimulationsbedingungen *in vitro* exprimieren die IL-17-positiven Zellen auf Proteinebene IL-17 und IFN- γ sowie auf mRNA-Ebene ROR γ t und T-bet.

4.1.2.2.2. Stabilität und Plastizität von T_H17-Zellen isoliert aus MOG₃₅₋₅₅-immunisierten Mäusen in der Effektorphase

Für die Sortierung von T_H17-Zellen *ex vivo* der Effektorphase aus dem ZNS MOG₃₅₋₅₅-immunisierter Mäuse sollten die Tiere einen klinischen Score von mindestens 2 aufweisen. Zu diesem Zeitpunkt sind bereits Lymphozyten in das ZNS migriert. Dabei muss beachtet werden, dass durch die Isolierung der Lymphozyten (enzymatischer Verdau und Dichtezentrifugation zur Anreicherung der Lymphozyten) aus dem ZNS deren Ausbeute sehr gering ist und die Zellen zusätzlichem Stress ausgesetzt sind. Aus diesem Grund wurden für dieses Experiment in 30 C57BL/6 Mäusen eine EAE ausgelöst. Ab Tag 10 nach Immunisierung entwickelten die Tiere erste klinische Zeichen (Abb.17). Am Tag 14 – dem Tag der Sortierung – wiesen die meisten Tiere einen Score von 2,5 auf, dabei betrug die Inzidenz in diesem Experiment 100 %.

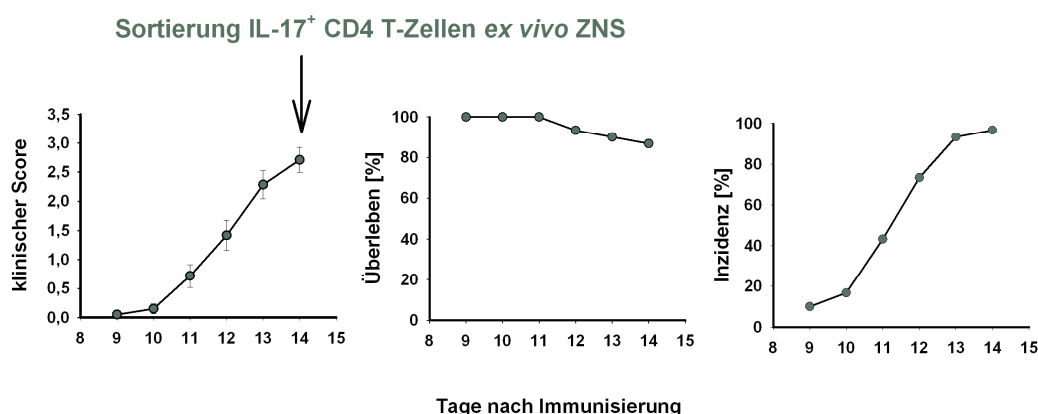


Abb. 17. Klinischer Score, Überleben und Inzidenz der Mäuse in der Effektorphase der EAE. 30 C57BL/6 Mäuse wurden mit 200 μ g MOG₃₅₋₅₅ in CFA immunisiert. Am Tag 0 und 2 wurde den Mäusen zusätzlich 200 ng Pertussistoxin appliziert. Die Mäuse wurden täglich begutachtet und anhand eines klinischen Scores wie folgt bewertet: Score 0 = keine Symptome, 1 = Schwanzparalyse, 2 = paralyzierter Schwanz und Motilitätsbeeinträchtigungen, 3 = Paralyse von Schwanz und Hinterbeinen, 4 = Tetraplegie, 5 = moribund oder tot. Zusätzlich dargestellt ist das Überleben der Tiere und die Inzidenz (in %).

Die T_H17-Zellen wurden – wie bereits beschrieben – mithilfe des IL-17 CSA sortiert (Abb.18). Dabei wurde eine Reinheit von 96,5% IL-17⁺ CD4⁺ T-Zellen erreicht (siehe Re-analyse Abb.18).

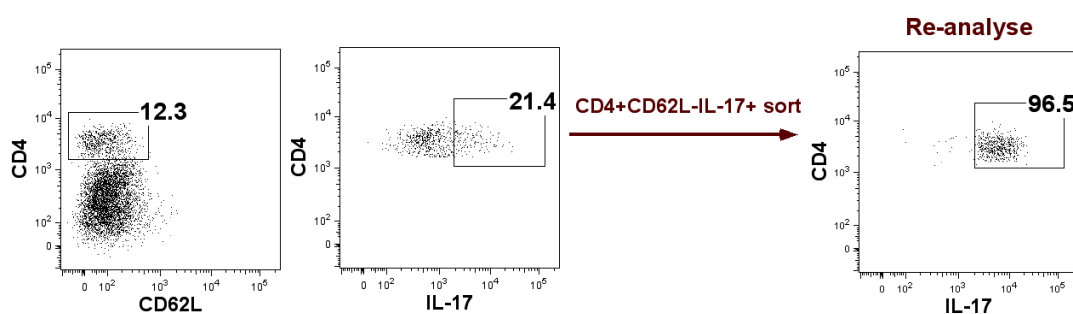


Abb. 18. Sortierung der CD4⁺CD62L⁻IL-17⁺ T-Zellen aus dem ZNS EAE-erkrankter Mäuse. Am Tag 14 nach Immunisierung von 30 BL/6 Mäusen mit MOG₃₅₋₅₅ in CFA wurde das ZNS der Tiere in einem enzymatischen Ansatz verdaut und über einen Dichtegradienten die Lymphozyten angereichert. Mithilfe des murinen IL-17 CSA wurden die IL-17-positiven CD4⁺CD62L Zellen am FACSaria sortiert. Tote Zellen wurden mit PI markiert und ausgegrenzt. Die Re-analyse der CD4⁺CD62L⁻IL-17⁺ Fraktion zeigt eine Reinheit von 96,5 %. Dieses Experiment wurde einmal durchgeführt.

Die Zytokinanalyse zeigt, dass die Effektorzellen im ZNS am Tag 14 nach Immunisierung im Vergleich zu Splenozyten am Tag 7 nach Immunisierung (Abb.4) wesentlich mehr IL-17 (21,9 %) sowie IFN- γ (58,3 %) produzieren (Abb.19). Zusätzlich exprimieren die Hälfte der IL-17⁺ CD4⁺ T-Zellen auch IFN- γ (11,2 % IL-17⁺IFN- γ ⁺).

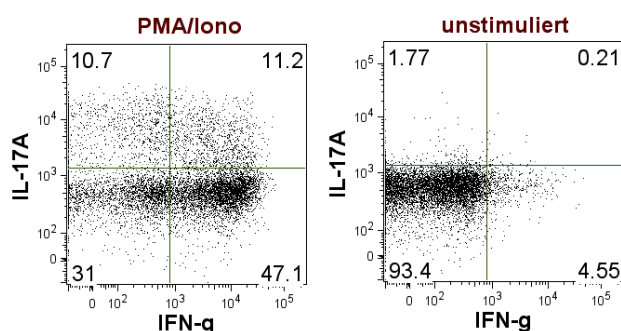


Abb. 19. Intrazelluläre Zytokinfärbung der Lymphozyten isoliert aus dem ZNS MOG₃₅₋₅₅-immunisierter Mäuse am Tag 14. In C57BL/6 Mäusen wurde eine EAE induziert. Am Tag 14 nach Immunisierung wurden die Zellen aus dem ZNS isoliert und für die intrazelluläre Zytokinfärbung mit PMA/Ionomycin und Brefeldin A 2 h restimuliert. Dargestellt ist die *frequency of parent* (bezogen auf CD4⁺ T-Zellen) der Zytokine IL-17 und IFN- γ nach dem Ausschluss der toten Zellen.

Aus dem ZNS der 30 Mäuse wurden 150.000 IL-17-produzierende CD4⁺CD62L⁻ Zellen sortiert (Abb.18). Die Zellen wurden in 500 μ l Kulturmedium aufgenommen und anschließend 30.000 Zellen pro *well* zusammen mit bestrahlten APCs und MOG₃₅₋₅₅ *in vitro* unter den verschiedenen polarisierenden Bedingungen 6 Tage kultiviert. Am Tag 6 erfolgte nach polyklonaler Restimulation die intrazelluläre Zytokinfärbung auf IL-17 und IFN- γ .

Wie in Abb.20 zu sehen, verlieren die sortierten T_H17-Zellen die Fähigkeit IL-17 zu produzieren und zeigen nur noch zwischen 11 und 13 % IL-17-Expression unter den verschiedenen

Polarisierungsbedingungen. Im Gegensatz dazu kommt es zu einem Anstieg an IFN- γ in den CD4⁺ T-Zellen (22,6 % IFN- γ unter T_H17-Bedingungen; 26,4 % IFN- γ unter T_H1-Bedingungen; 19,4 % IFN- γ unter neutralen Bedingungen). Die Stimulation mit IL-23 hat keine stabilisierende Wirkung auf die IL-17-Expression.

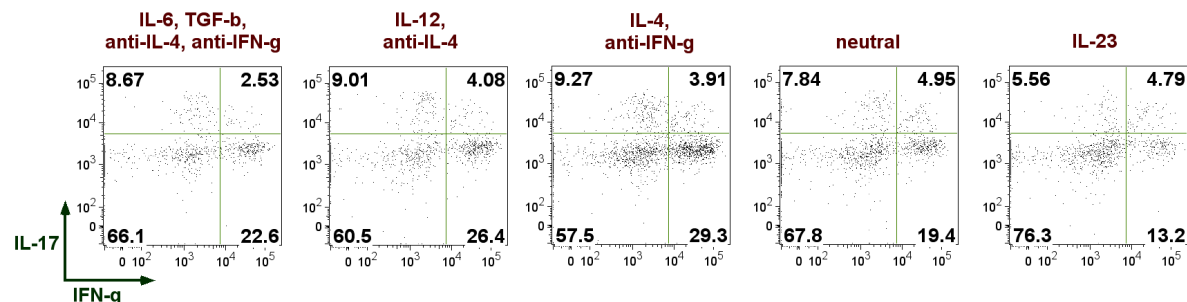


Abb. 20. Zytokinexpression der T_H17-Zellen *ex vivo* MOG₃₅₋₅₅-immunisierter Mäuse in der Effektorphase nach definierten Kulturbedingungen. Am Tag 14 nach Immunisierung von 30 C57BL/6 Mäusen mit MOG₃₅₋₅₅ wurden die Lymphozyten aus dem ZNS isoliert und für den IL-17 CSA polykonal restimuliert. Nach Sortierung der T_H17-Zellen wurden diese Zellen zusammen mit bestrahlten APCs und MOG₃₅₋₅₅ unter unterschiedlichen Polarisierungsbedingungen kultiviert (T_H17-Bedingung: IL-6, TGF- β , anti-IL-4, anti-IFN- γ ; T_H1-Bedingung: IL-12, anti-IL-4; T_H0-Bedingung = neutral: ohne polarisierende Zytokine bzw. Antikörper). Am Tag 6 *in vitro* erfolgte die Restimulation und das Zytokinprofil wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dabei wurden zunächst tote Zellen mit ViD markiert. Im Dotplot dargestellt sind die Zytokine IL-17 gegen IFN- γ als *frequency of parent* bezogen auf die CD4⁺ T-Zellen. Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

Die Ergebnisse aus dem EAE-Modell zeigen, dass die Stabilität von T_H17-Zellen vom Isolationszeitpunkt und somit vom Stadium der Erkrankung abhängig ist. T_H17-Zellen sowohl aus der Induktionsphase als auch aus der Effektorphase verlieren die Fähigkeit zur IL-17-Expression. Während T_H17-Zellen, isoliert aus der Milz in der Induktionsphase der EAE (Abb.15) *in vitro* zu T_H1/T_H17-Zellen konvertieren, zeigen T_H17-Zellen *ex vivo* der Effektorphase aus dem ZNS eine wesentlich stärkere IFN- γ -Expression unter den gewählten Kulturbedingungen (Abb.20).

4.2. IL-17 als Regulator der Immunpathologie im Influenzavirus Infektionsmodell

In diesem Abschnitt soll die Funktion des Zytokins IL-17 in einem viralen Infektionsmodell untersucht werden. Dafür wurden C57BL/6 Böcke mit dem Influenzavirus A/PR/8/34 (H1N1) intranasal (i.n.) infiziert, welches freundlicherweise von Prof. Andreas Henke vom Institut für Virologie und Antivirale Therapie, Universitätsklinikum Jena, zur Verfügung gestellt wurde.

4.2.1. Infiltration neutrophiler Granulozyten nach IL-17-Produktion in Influenzavirus-infizierten Mäusen

C57BL/6 Mäuse wurden mit 30 *plaque forming units* (pfu) H1N1 i.n. infiziert und am Tag 1, 2, 3 und 7 analysiert. Die Lungen wurden entnommen und mittels Collagenase enzymatisch verdaut. Daraufhin konnte die Anzahl der Leukozyten pro Lunge ermittelt werden. Nach der Infektion ist zunächst eine Zunahme der Leukozyten in der Lunge zu verzeichnen (Abb. 21A). Die Zellen wurden weiter charakterisiert, indem die Zellen der Lunge über die Expression von Oberflächenmarkern im Durchflusszytometrie identifiziert wurden. Bereits am Tag 3 *post infectionem* (p.i.) kommt es zu einem massiven Anstieg neutrophiler Granulozyten, als Vertreter des angeborenen Immunsystems, in der Lunge (Abb.21B). Die Neutrophilen wurden über die Expression von CD11b und GR-1 im Durchflusszytometer identifiziert (siehe Dotplot Abb.21B).

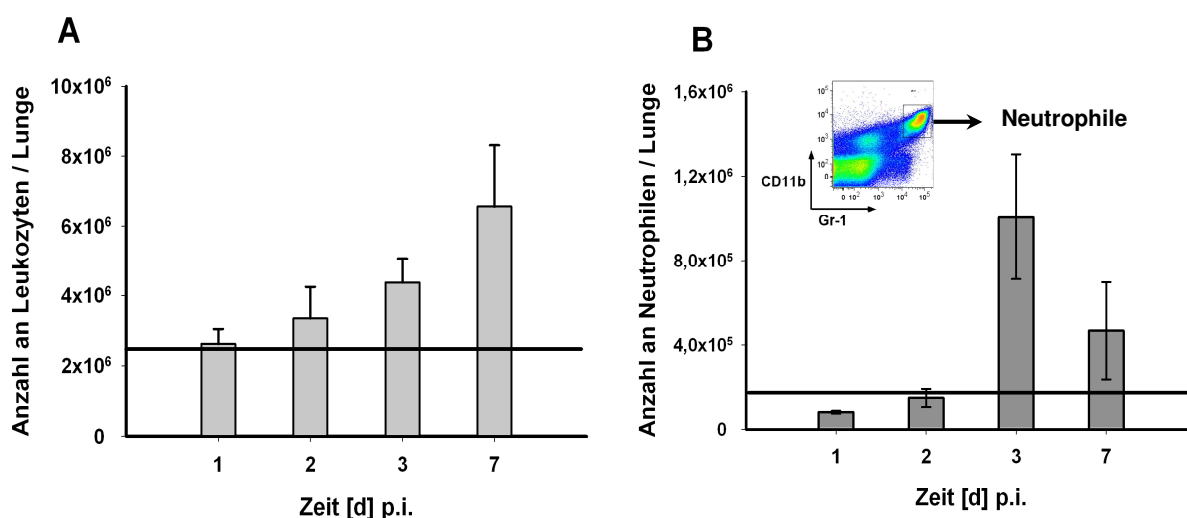


Abb. 21. Zahl der Leukozyten und neutrophiler Granulozyten nach Influenzavirus Infektion. C57BL/6 Mäuse wurden mit 30 pfu A/PR/8/34 (H1N1) i.n. infiziert. Am Tag 1, 2, 3 und 7 p.i. erfolgte die individuelle Analyse der Lungen. Dafür wurden die Lungen enzymatisch verdaut, um die Anzahl der Leukozyten pro Lunge zu bestimmen (**A**). Die Charakterisierung der Neutrophilen erfolgte über die Expression von CD11b und Gr-1 im Durchflusszytometer. Die absolute Anzahl an neutrophilen Granulozyten pro Lunge wurde über die *frequency of total* und die Gesamtzellzahl der Lunge berechnet (**B**). Gezeigt sind die Mittelwerte ($n = 4$) \pm SEM. Die schwarze Linie repräsentiert die Anzahl der Leukozyten bzw. Neutrophilen in der Lunge einer naiven Maus. Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

Neben den Neutrophilen, die quantitativ einen großen Anteil in der Lunge ausmachen, wurde auch die Zahl der CD4⁺, CD8⁺, $\gamma\delta$, NK1.1⁺ T-Zellen sowie NK1.1⁺ Zellen mithilfe durchflusszytometrischer Analysen bestimmt. Die $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T-Zellen wurden über die Expression von CD3 und des jeweiligen T-

Zell-Korezeptors (CD4 oder CD8) der $\alpha\beta$ T-Zellen bzw. über den $\gamma\delta$ TZR identifiziert. NK1.1⁺ T-Zellen unterscheiden sich zu den NK1.1⁺ Zellen in der Expression von CD3.

Abb.22 zeigt die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten. Dargestellt sind die Zellpopulationen in der Lunge nach einer H1N1-Infektion, beispielsweise für Tag 7 p.i. im Vergleich zu Tag 0 (= naiv). Pro Zeitpunkt wurden 4 Mäuse analysiert, wobei die Daten mittels der Funktion „Data concatenated“ der FlowJo®Software zusammengefasst wurden. Prozentual sind die CD4⁺ T-Zellen mit 21,8 % in den Lungen naiver Mäuse am häufigsten vertreten. 15,4 % der Leukozyten sind CD8⁺ T-Zellen und 19,8 % NK1.1⁺ Zellen. Mit lediglich 0,36 % und 0,25 % sind unkonventionelle T-Zellen wie NK1.1⁺ und $\gamma\delta$ T-Zellen in den Lungen naiver Mäuse vorhanden. Am Tag 7 nach Infektion kommt es zu einer Zunahme der CD8⁺, NK1.1⁺ und $\gamma\delta$ T-Zellen sowie der NK1.1⁺ Zellen.

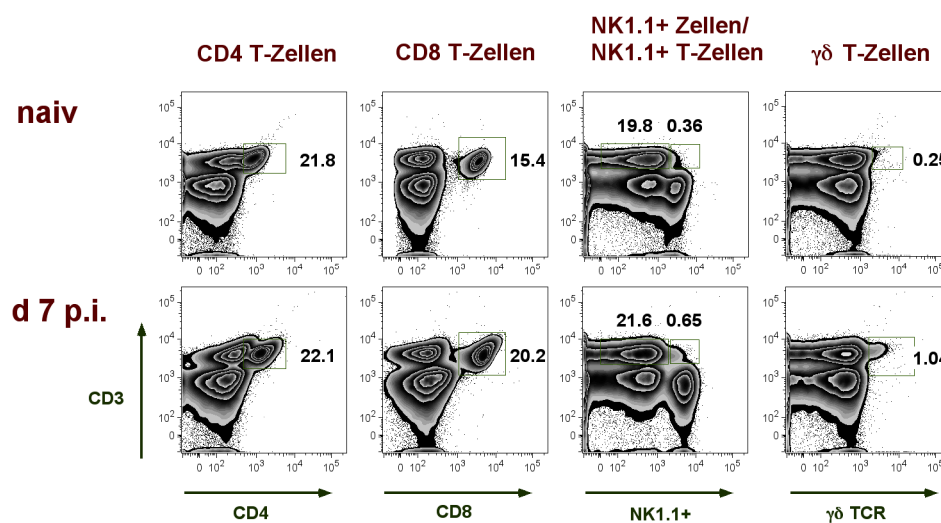


Abb. 22. Charakterisierung der Zellpopulationen in der Lunge der Influenzavirus-infizierten Mäuse. Am Tag 7 nach Infektion mit 30 pfu H1N1 wurden die Lungen der Mäuse entnommen und enzymatisch verdaut, um die Leukozyten zu isolieren. Mittels Durchflusszytometrie wurden CD4⁺, CD8⁺, NK1.1⁺ und $\gamma\delta$ T-Zellen sowie NK1.1⁺ Zellen identifiziert. Parallel dazu erfolgte die Analyse naiver Mäuse. Dargestellt ist die Frequenz der Zellpopulationen bezogen auf vitale Lymphozyten (*frequency of parent*), wobei die Daten von je 4 Mäusen mithilfe der Funktion „Data concatenated“ der FlowJo®Software zusammengefasst wurden.

Anhand der *frequency of total* und der absoluten Zellzahl der Lunge konnte anschließend die Zellzahl der einzelnen Zelltypen in der Lunge kalkuliert werden (Abb.23). Die absolute Anzahl an CD4⁺ T-Zellen, wie auch die der CD8⁺ und NK1.1⁺ Zellen, nimmt im Laufe der Infektion zu. Auch die zahlenmäßig gering vertretenen Zelltypen wie $\gamma\delta$ und NK1.1⁺ T-Zellen nehmen im Infektionsverlauf zu. Vergleicht man die Zellpopulationen untereinander, ist anzumerken, dass die Anzahl der CD4⁺ T-Zellen im Laufe der Infektion um das fünffache und die $\gamma\delta$ T-Zellen etwa um das sechsfache ansteigen.

In mehreren Publikationen ist bereits gezeigt worden, dass die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten u.a. durch das Zytokin IL-17 hervorgerufen wird. Aus diesem Grund wurde als nächstes die IL-17-Produktion der bereits identifizierten Zellpopulationen in der Lunge aus Abb.23 unmittelbar nach der Infektion untersucht. Auf diese Weise wurden die IL-17-Produzenten identifiziert, welche für die rapide Zunahme der neutrophilen Granulozyten in der Lunge nach H1N1-Infektion verantwortlich sein könnten. Nach Isolation der Leukozyten wurden diese für 4 h polyklonal restimuliert und anschließend mit

Fluorochrom-markierten Antikörpern intrazellulär gefärbt. Die Zellen wurden im Durchflusszytometer analysiert und die Daten ausgewertet. In Abb.24 sind in den Dotplots die IL-17- und IFN- γ -Expression der jeweiligen Zellpopulation am Tag 1 p.i. von jeweils 4 Mäusen (*Data concatenated*) im Vergleich zu naiven Mäusen dargestellt.

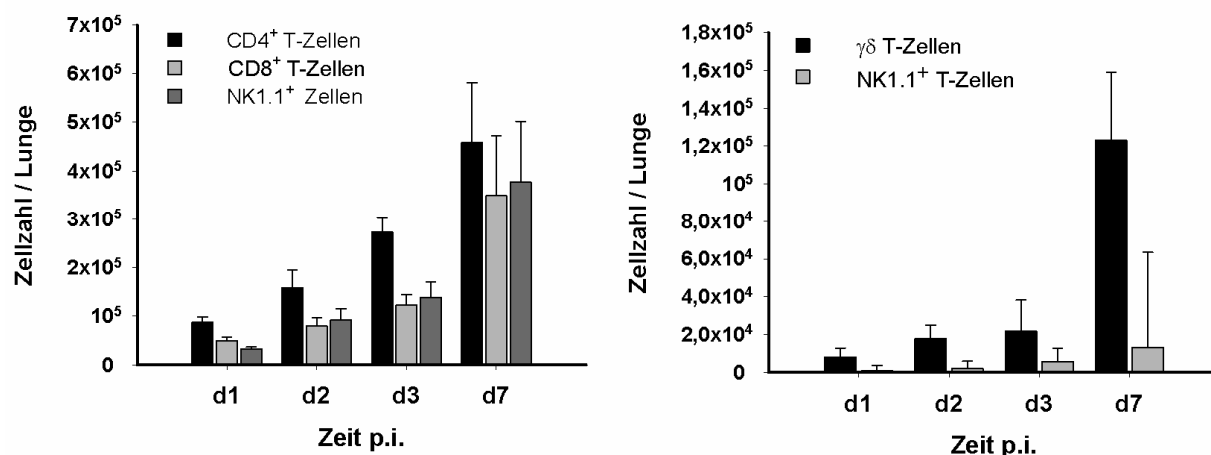


Abb. 23. Zahl der CD4⁺, CD8⁺, $\gamma\delta$, NK1.1⁺ T-Zellen sowie NK1.1⁺ Zellen in der Lunge der Influenzavirus-infizierten Mäuse. C57BL/6 Mäuse wurden mit 30 pfu H1N1 i.n. infiziert. Am Tag 1, 2, 3 und 7 nach Infektion wurden die Lungen isoliert und die Leukozyten gewonnen. Mittels Durchflusszytometrie wurden CD4⁺, CD8⁺, NK1.1⁺ und $\gamma\delta$ T-Zellen sowie NK1.1⁺ Zellen identifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Gesamtzellzahl an CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD3⁺NK1.1⁺, CD3⁺NK1.1⁺ und CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁺ Zellen pro Lunge (n = 4) \pm SEM. Die Gesamtzellzahl wurde mithilfe der *frequency of total* (bezogen auf vitale Zellen) und der Zellzahl der Lunge kalkuliert.

Interessanterweise sind bereits $\gamma\delta$ T-Zellen aus naiven Mäusen nach polyklonaler Restimulation in der Lage IL-17 (13,9 %) zu produzieren (Abb.24, Abb.25A). Durch die Influenzavirus Infektion steigt die IL-17-Expression der $\gamma\delta$ T-Zellen auf 18,9 % am Tag 1 p.i.. Die konventionellen T-Zellen wie CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen exprimieren sehr wenig IL-17 (< 1 %). Dabei ist kein Anstieg der IL-17-Produktion der CD4⁺ T-Zellen zu beobachten, während es innerhalb der CD8⁺ T-Zellen zu einer Zunahme von 0,07 % IL-17 in naiven Mäusen auf 0,45 % IL-17 am Tag 1 nach Influenzavirus Infektion kommt. Die Influenzavirus Infektion führt auch in den NK1.1⁺ Zellen bzw. in den NK1.1⁺ T-Zellen nur zu einem leichten Anstieg der IL-17-Expression am Tag 1 nach Infektion.

Kalkuliert man jedoch die absolute Anzahl der IL-17-Produzenten mithilfe der ermittelten Anzahl an Leukozyten in der Lunge sind die IL-17-produzierenden $\gamma\delta$ T-Zellen eher gering vertreten und machen nur einen kleinen Teil der Zellen in der Lunge aus (Abb.25B).

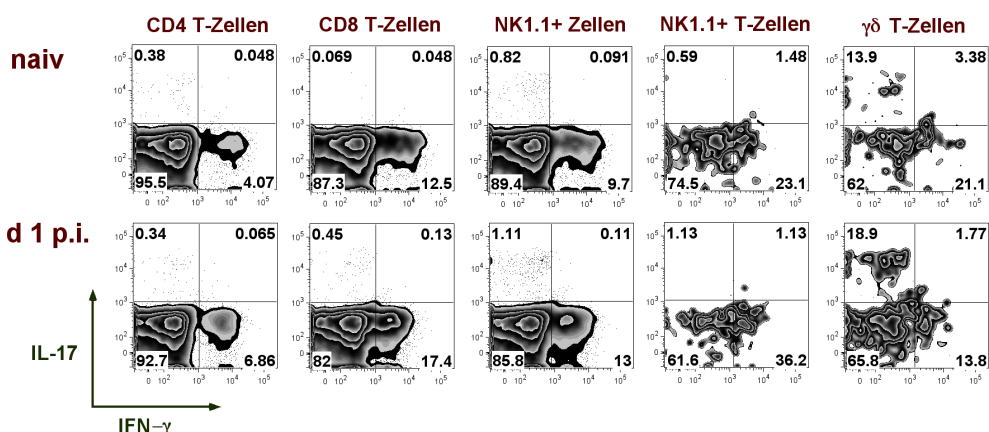


Abb. 24. Zytokinexpression in der Lunge am Tag 1 nach Influenzavirus Infektion. C57BL/6 Mäuse wurden mit 30 pfu H1N1 i.n. infiziert. Am Tag 1 nach Infektion wurden die Leukozyten aus der Lunge isoliert, für 4 h polyklonal restimuliert, mit Fluorochrom-markierten Antikörpern inkubiert und im Durchflusszytometer analysiert. Parallel dazu erfolgte die Analyse naiver Mäuse. Dargestellt ist die Expression von IL-17 und IFN- γ der CD4⁺, CD8⁺, NK1.1⁺ und $\gamma\delta$ T-Zellen sowie NK1.1⁺ Zellen. Die Daten von je 4 Mäusen wurden mithilfe der Funktion „Data concatenated“ der FlowJo®Software zusammengefasst.

Wie in Abb.24 zu sehen ist, wird von den Lungenzellen aus naiven Mäusen auch IFN- γ produziert. Der Anteil an IFN- γ -produzierenden Zellen nimmt am Tag 1 nach Infektion zu – insbesondere der NK1.1⁺ T-Zellen (von 23,1 % auf 36,2 %), aber auch der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie der NK1.1⁺ Zellen. Lediglich die $\gamma\delta$ T-Zellen exprimieren am Tag 1 p.i. mit 13,8 % weniger IFN- γ verglichen mit den Zellen aus naiven Mäusen (21,1 %).

Um zu zeigen, dass die IL-17-Produktion der konventionellen T-Zellen (CD4⁺ und CD8⁺) zu den frühen Zeitpunkten nach der Infektion Antigen-unspezifisch erfolgt, wurden für die Restimulation der Zellen drei verschiedene Influenzavirus-spezifische Nukleoprotein-Peptide ausgewählt (NP₂₆₁₋₂₇₅, NP₃₁₁₋₃₂₅, NP₃₆₆₋₃₇₄). Die Auswahl der Peptide bezieht sich vorwiegend auf die Publikation von Crowe *et al.*, 2005 [196]. Das Peptid NP₂₆₁₋₂₇₅ ist als MHC-II-basierendes Peptid beschrieben, während NP₃₆₆₋₃₇₄ von CD8⁺ T-Zellen über MHC-I erkannt wird [197]. Das Peptid NP₃₁₁₋₃₂₅ hingegen wird sowohl von CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen über deren MHC Moleküle erkannt. Nach Restimulation mithilfe des jeweiligen Peptids wurden die Antigen-spezifischen Zytokin-produzierenden CD4⁺ T-Zellen über die Expression von CD154 identifiziert (Abb.26). Die Expression von CD154 ist abhängig von der Aktivierung der T_H-Zellen über den T-Zell-Rezeptor. Somit ist es möglich über CD154 Antigen-spezifische T_H-Zellen zu identifizieren [186].

Am Tag 3 nach Infektion konnten nach Restimulation mit dem Peptid NP₃₁₁₋₃₂₅, welches sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen aktiviert, noch keine Antigen-spezifischen CD154⁺CD4⁺ T-Zellen in der Lunge analysiert werden (Abb.26A). Demzufolge konnte auch am Tag 3 p.i. nach Antigen-spezifischer Restimulation keine Expression von IL-17 bzw. IFN- γ der CD154⁺CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen werden. Lediglich nach polyklonaler Restimulation kommt es zur IFN- γ Expression der CD4⁺ T-Zellen. Hingegen führt die Antigen-spezifische Restimulation am Tag 7 (Abb.26B) zu einer Zunahme der Frequenz an CD154⁺CD4⁺ T-Zellen in der Lunge (Restimulation mit NP₂₆₁₋₂₇₅ 0,19 % CD154⁺CD4⁺ T-Zellen, Restimulation mit NP₃₁₁₋₃₂₅ 0,25 % CD154⁺CD4⁺ T-Zellen). Durch die Restimulation mit NP₂₆₁₋₂₇₅ bzw. NP₃₁₁₋₃₂₅ produzieren ca. 45 % der Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen IFN- γ , jedoch kein IL-17.

Fokussierend auf die IL-17-Produktion ist festzustellen, dass ein kleiner Anteil von 0,49 % der CD4⁺ T-Zellen IL-17 produziert, jedoch ausschließlich nach Restimulation mit PMA und Ionomycin und nicht mit den in dieser Arbeit verwendeten NP-Peptiden. Auch in der unstimulierten Probe sind 0,081 % CD154⁺CD4⁺ T-Zellen vorhanden, von denen wiederum 33 % IFN- γ produzieren. Damit wird deutlich, dass die Zellen *ex vivo* aktiv sind und die Immunantwort die Virusinfektion akut bekämpft.

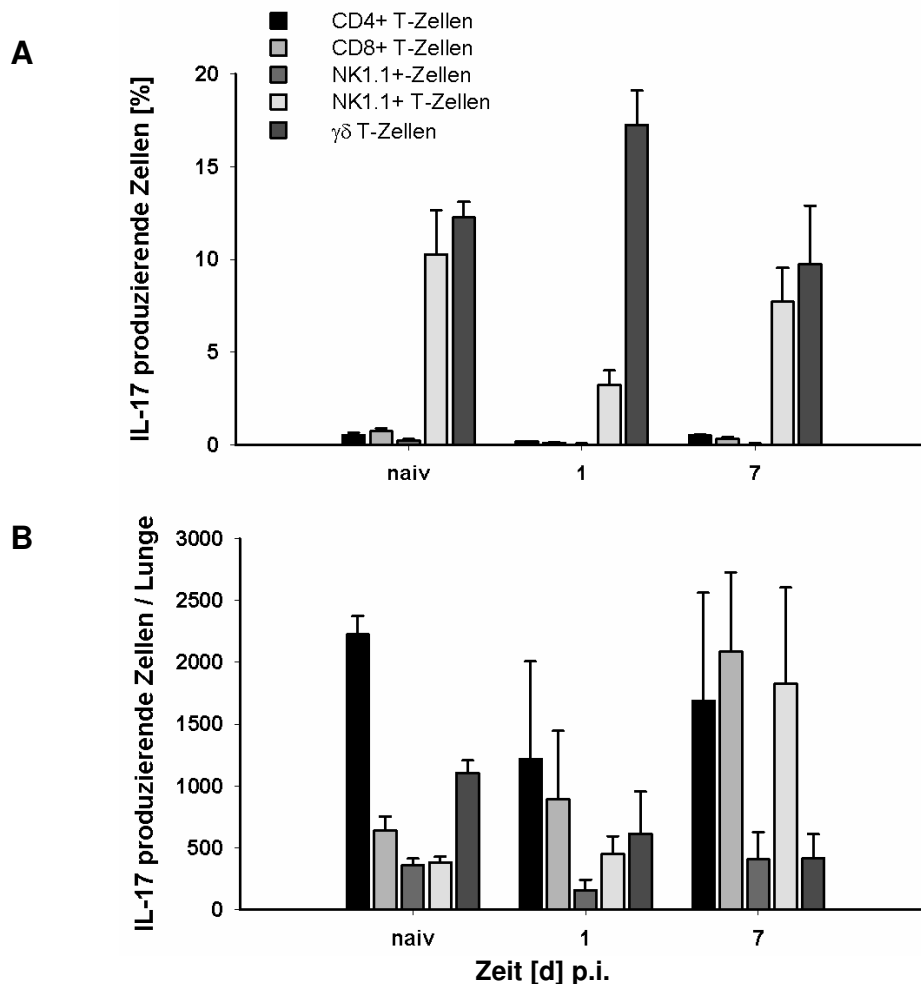


Abb. 25. IL-17-Produzenten in der Lunge der Influenzavirus-infizierten Mäuse. Am Tag 0 (= naiv), 1 und 7 nach Infektion mit 30 pfu H1N1 wurden die Leukozyten aus den Lungen der Mäuse isoliert und mit PMA und Ionomycin restimuliert. Mittels Durchflusszytometrie wurden CD4⁺, CD8⁺, NK1.1⁺ und $\gamma\delta$ T-Zellen sowie NK1.1⁺ Zellen identifiziert sowie deren IL-17-Expression analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Frequenzen (**A**) bzw. die absolute Anzahl (**B**) an IL-17-produzierenden CD4⁺, CD8⁺, NK1.1⁺, $\gamma\delta$ T-Zellen sowie NK1.1⁺ Zellen (n = 4) \pm SEM. Die Gesamtzellzahl (**B**) wurde mithilfe der *frequency of total* und der Zellzahl der Lunge kalkuliert.

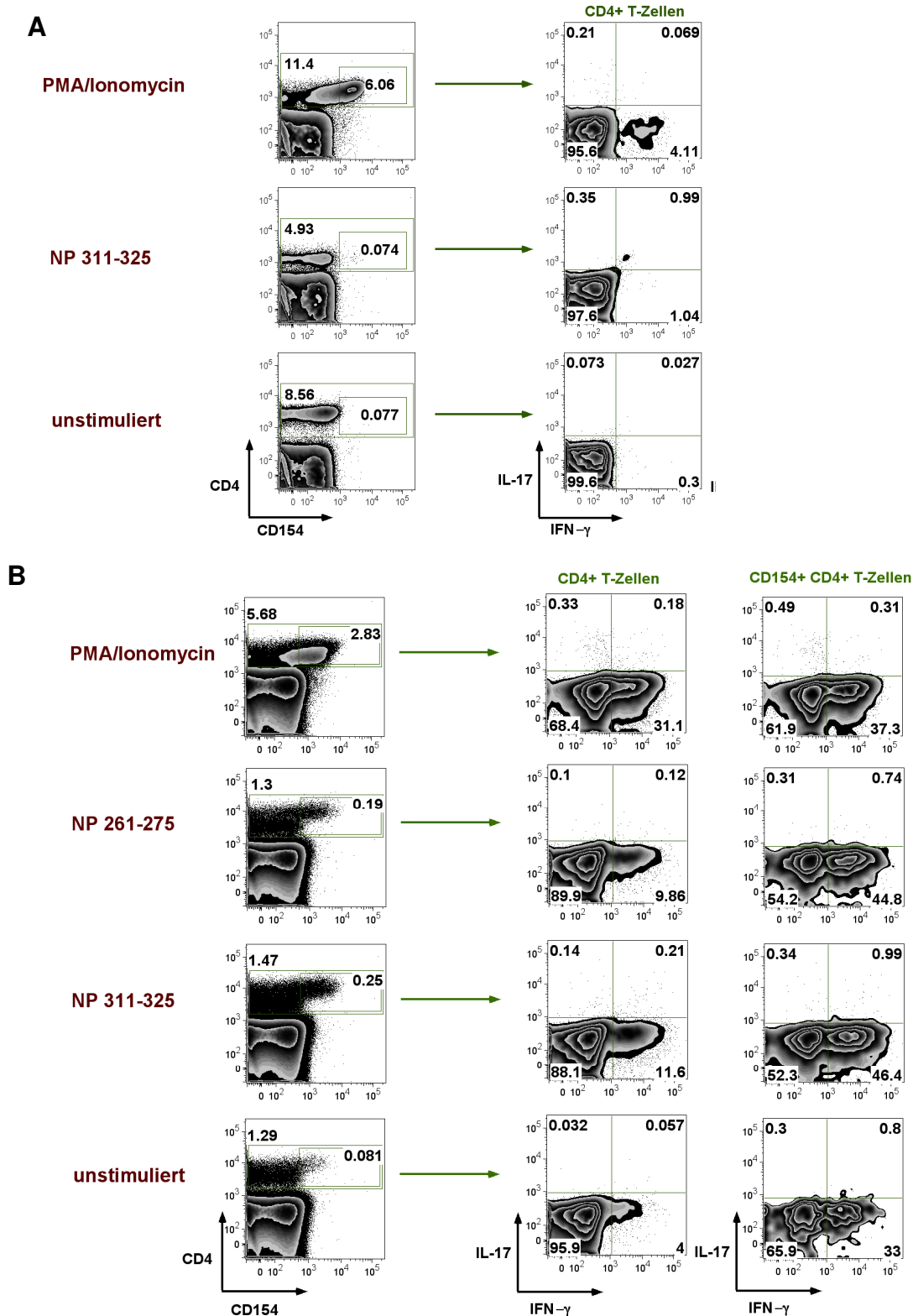


Abb. 26. Antigen-spezifische Zytokinproduktion der CD4⁺ T-Zellen in der Lunge der Influenzavirus-infizierten Mäuse. C57BL/6 Mäuse wurden mit 30 pfu H1N1 i.n. infiziert. Am Tag 3 (A) bzw. am Tag 7 p.i. (B) wurden Leukozyten aus der Lunge isoliert und mit NP₃₁₁₋₃₂₅ oder NP₂₆₁₋₂₇₅ für 6 h restimuliert. Als Kontrolle wurden die Zellen polyklonal mit PMA und Ionomycin restimuliert bzw. nicht stimuliert. Anschließend wurden die Zellen auf CD4, CD154 sowie die Zytokine IL-17 und IFN- γ gefärbt. Dargestellt ist die Frequenz (*frequency of parent*) der CD4⁺ als auch der CD154⁺CD4⁺ T-Zellen sowie die Zytokinproduzenten bezogen auf CD4⁺ oder Antigen-spezifische CD154⁺CD4⁺ T-

Zellen. Die Daten von je 4 Mäusen wurden mithilfe der Funktion „Data concatenated“ der FlowJo®Software zusammengefasst.

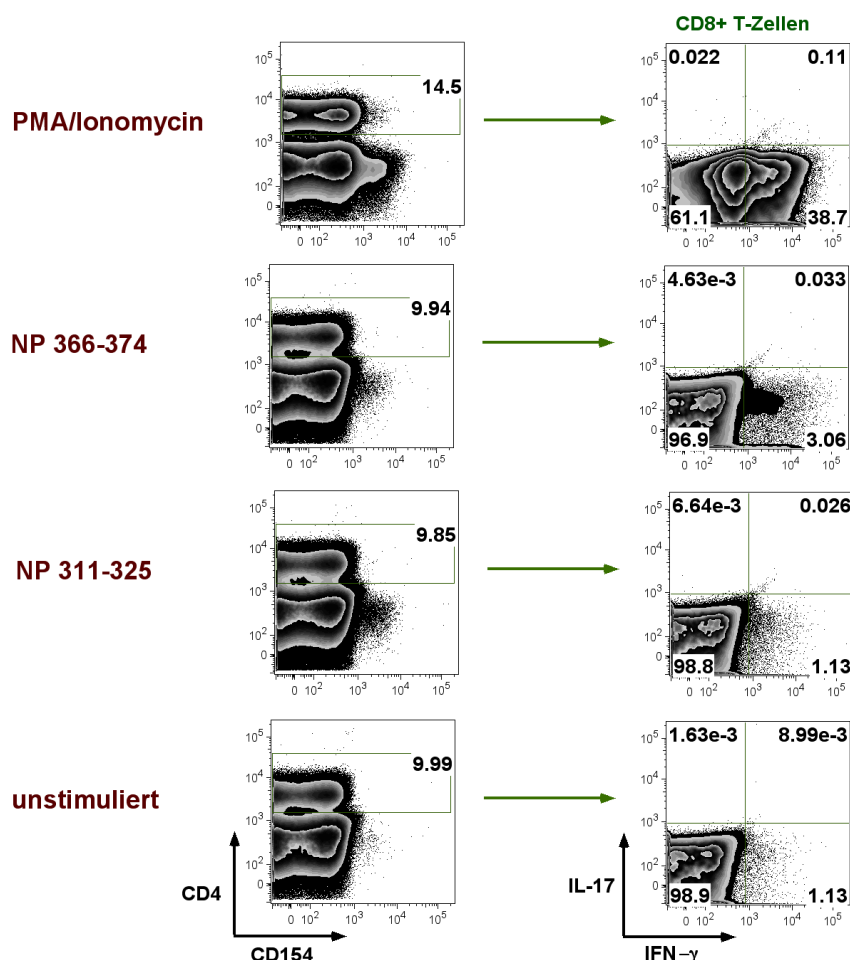


Abb. 27. Antigen-spezifische Zytokinproduktion der CD8⁺ T-Zellen in der Lunge der Influenzavirus-infizierten Mäuse. Am Tag 7 nach Influenzavirus-Infektion (30 pfu H1N1) wurden die Leukozyten der Lunge isoliert und mit NP₃₁₁₋₃₂₅ oder NP₃₆₆₋₃₇₄ für 6 h restimuliert. Als Kontrolle wurden die Zellen polyklonal mit PMA und Ionomycin restimuliert bzw. nicht stimuliert. Anschließend wurden die Zellen auf CD8, CD154 und die Zytokine IL-17 und IFN-γ gefärbt. Dargestellt ist die Frequenz (*frequency of parent*) der CD8⁺ T-Zellen sowie die Zytokinproduzenten bezogen auf die CD8⁺ T-Zellen. Die Daten von je 4 Mäusen wurden mithilfe der Funktion „Data concatenated“ der FlowJo®Software zusammengefasst.

In Bezug auf CD8⁺ T-Zellen führt weder die Restimulation mit den Influenza-spezifischen Peptiden noch mit PMA und Ionomycin zu einer erhöhten Expression von CD154 am Tag 7 nach Infektion (Abb.27). Jedoch kann mit den CD8⁺ T-Zell-spezifischen Nukleoprotein-Peptid NP₃₆₆₋₃₇₄ eine höhere IFN-γ-Expression hervorgerufen werden (3,06 %) als mit dem Peptid NP₃₁₁₋₃₂₅ (1,13 %), welches sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen aktiviert. Auch unstimulierte CD8⁺ T-Zellen exprimieren IFN-γ am Tag 7 nach Infektion (1,13 %). Eine Antigen-spezifische Expression von IL-17 der CD8⁺ T-Zellen ist nach Stimulation mit den ausgewählten Peptiden nicht zu beobachten.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Antigen-spezifische Zytokinantwort der CD4⁺ T-Zellen am Tag 3 p.i. noch nicht ausgeprägt ist. Erst am Tag 7 nach Infektion ist eine Influenza-spezifische Zytokinproduktion der konventionellen T-Zellen zu sehen, wobei jedoch kein IL-17 nachweisbar ist (Abb.26, Abb.27).

Hingegen konnte gezeigt werden, dass etwa 20 % der $\gamma\delta$ T-Zellen der Lunge bereits am Tag 1 p.i. IL-17 exprimieren (Abb.24). Auch $\gamma\delta$ T-Zellen der Lunge aus naiven Mäusen besitzen nach polyklonaler Restimulation die Fähigkeit zur IL-17-Expression.

Nach Infektion mit H1N1 kommt es in den Lungen der Mäuse zu einem massiven Anstieg der neutrophilen Granulozyten. Wie bereits in mehreren Publikationen beschrieben ist, wird die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten durch die lokale Expression von IL-17 hervorgerufen [83, 178, 198]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass vermutlich $\gamma\delta$ T-Zellen in der Lunge für die frühe IL-17-Antwort nach Infektion verantwortlich sind.

4.2.2. IL-17 – Blockade in Influenzavirus-infizierten Mäusen

Nach Influenzavirus Infektion in C57BL/6 Mäusen kommt es zur Expression von IL-17 in den Lungen. Die Expression von IL-17 führt u.a. zur Rekrutierung neutrophiler Granulozyten. Daraus ergibt sich folgende Frage: Welche Folgen hat die Blockade dieses Zytokins auf den Verlauf der Infektion?

4.2.2.1. Auswirkung der anti-IL-17-Applikation auf Gewicht, Überleben und Viruslast in der Lunge

Um herauszufinden welche Funktion IL-17 während einer Influenzavirus Infektion hat, wurden C57BL/6 Böcke mit A/PR/8/34 (H1N1) i.n. infiziert und IL-17 mit einem monoklonalen Antikörper, Klon MM17F3 (Maus IgG1) [199], blockiert. Die intraperitoneale (i.p.) Applikation von 300 μ g anti-IL-17 erfolgte aller 2 Tage, beginnend am Tag 1 p.i.. Den Kontrolltieren wurde Maus-IgG analog injiziert (Abb.28).

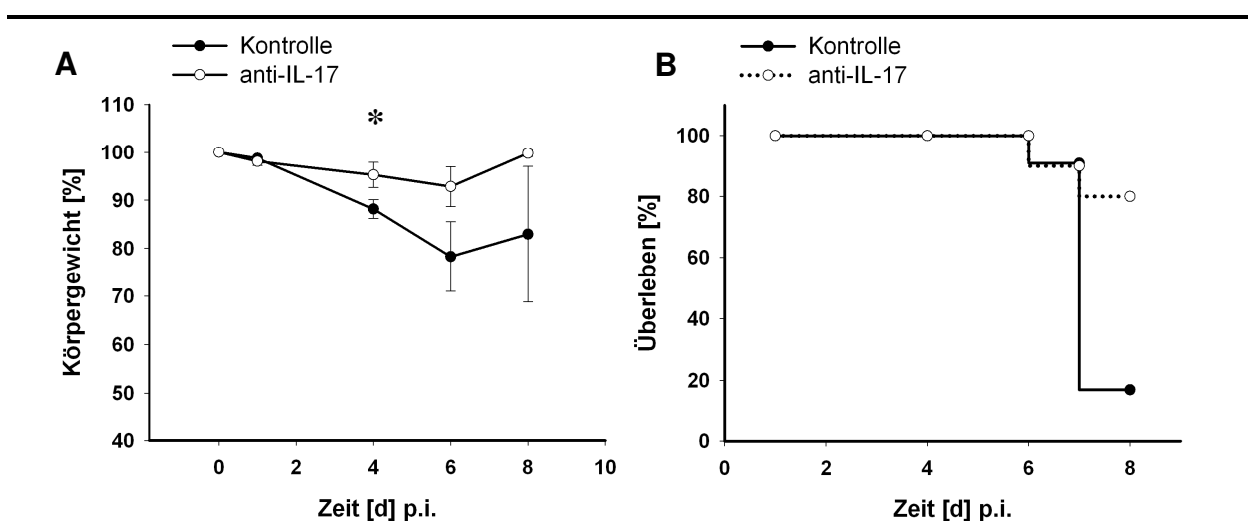


Abb. 28. Auswirkung der IL-17 – Blockade auf Körpergewicht und Überleben der Mäuse nach H1N1-Infektion.

C57BL/6 Mäuse wurden mit 45 pfu H1N1 i.n. infiziert. Mäusen einer Gruppe wurde am Tag 1, 3, 5 und 7 p.i. 300 μ g anti-IL-17 (Klon MM17F3) i.p. appliziert. Den Kontrolltieren wurde zeitgleich je 300 μ g Maus-IgG i.p. injiziert. Die Tiere wurden bis Tag 8 regelmäßig begutachtet und gewogen. Dargestellt ist der Mittelwert der individuellen Körpergewichte in % ($n = 10 \pm$ SEM (A) sowie die Überlebensrate in % (B). Das Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt. Die Signifikanz am Tag 4 ($p < 0,05$ *) wurde mithilfe des Mann-Whitney U-Test ermittelt.

Während des Krankheitsverlaufes wurde das Körpergewicht der Tiere beobachtet. Die IL-17 – Blockade führt zu einem mildereren Krankheitsverlauf nach einer hohen Infektionsdosis von 45 pfu H1N1. Dies äußert sich in einem geringeren Gewichtsverlust der erkrankten Tiere (Abb. 28A). Die hohe Infektionsdosis führt darüber hinaus zu einer erhöhten Mortalität, welche durch die anti-IL-17-Applikation

reduziert wird (Abb.28B). Aufgrund des hohen Gewichtsverlustes von über 30 % der Kontrolltiere mussten die Experimente, in denen die hohe Infektionsdosis verwendet wurde, am Tag 8 ± 1 abgebrochen und die Versuchstiere euthanasiert werden. Auch nach einer sublethalen Infektionsdosis von 30 pfu H1N1 führt die IL-17 – Blockade zu einem mildereren Krankheitsverlauf im Vergleich zur Kontrollgruppe. Während sich das Körpergewicht der mit anti-IL-17-behandelten Tiere um maximal 5 % verringert, kommt es zu einer Reduktion der Körpermasse um 15 % in der Kontrollgruppe (Abb.29).

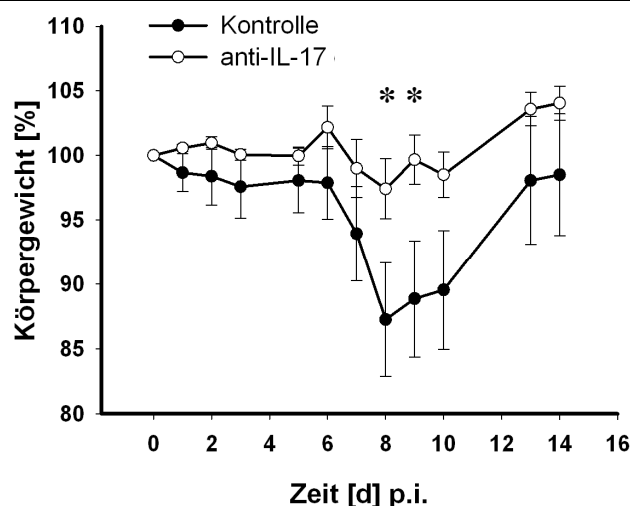


Abb. 29. Auswirkung der IL-17 – Blockade auf das Körpergewicht der Mäuse nach einer sublethalen Infektionsdosis H1N1. C57BL/6 Mäuse wurden mit 30 pfu H1N1 infiziert. Die Applikation des anti-IL-17-Antikörpers (Klon MM17F3, 300 µg) bzw. des Maus-IgG erfolgte am Tag 1, 3, 5 und 7 p.i.. Die Tiere wurden bis Tag 14 nach Infektion regelmäßig begutachtet. Dargestellt ist der Mittelwert der individuellen Körpergewichte in % ($n = 10$) \pm SEM. Das Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt. Die Signifikanz am Tag 8 und 9 p.i. ($p < 0,05$ *) wurde mithilfe des Mann-Whitney U-Test ermittelt.

Neben äußeren sichtbaren, klinischen Zeichen (Gewichtsverlust, Mortalität) wurde auch die Viruslast in den Lungen der infizierten Tiere analysiert. Dafür wurde RNA aus Lungengewebe isoliert und mittels quantitativer PCR die cDNA von M2 nachgewiesen. M2 kodiert für ein Ionenkanalprotein des Influenza A Virus. Über das sogenannte *housekeeping* Gen β -Aktin konnte die relative Expression von M2 berechnet werden. Die Injektion von anti-IL-17 hat keine Auswirkung auf die Viruslast in der Lunge am Tag 3 nach Infektion. Im Gegensatz dazu kommt es durch die Applikation von anti-IL-17 zu einer Herunterregulierung der Expression von M2, und damit der Viruslast, am Tag 6 nach Infektion (Abb.30).

Um zu prüfen, ob der Effekt der anti-IL-17-Behandlung Virusstamm-spezifisch ist, wurden C57BL/6 Böcke mit dem Influenzavirus A/Hongkong/1/68 (H3N2) infiziert und gleichermaßen behandelt. Die Infektion mit der maximalen Dosis von $5 \cdot 10^4$ pfu H3N2 führt im Allgemeinen zu einem wesentlich mildereren Krankheitsverlauf im Vergleich zu dem hoch-pathogenen Stamm A/PR/8/34 (H1N1). Auch nach Infektion mit H3N2 führt die anti-IL-17-Applikation zu einem geringeren Gewichtsverlust der Mäuse vergleichend zu der Kontrollgruppe (Abb.31). Zusätzlich konnte am Tag 14 nach Infektion Virus-spezifische M2 cDNA in den Lungen der Kontrolltiere nachgewiesen werden. In den anti-IL-17-behandelten Mäusen konnte zu diesem Zeitpunkt keine Viruslast mehr festgestellt werden (Tab.13).

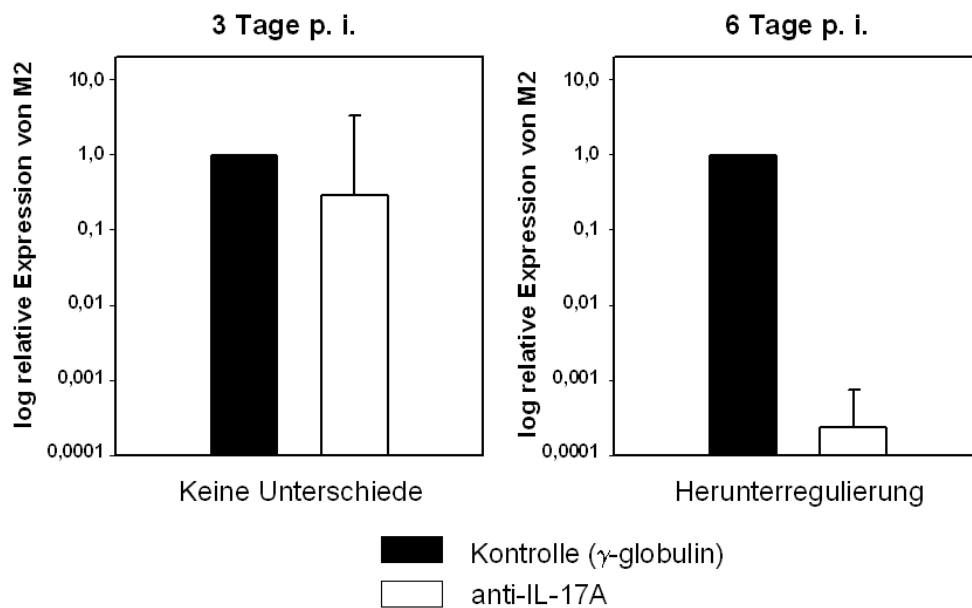


Abb. 30. Auswirkung der IL-17 – Blockade auf die Viruslast in Influenzavirus-infizierten Mäusen. Die H1N1-infizierten C57BL/6 Mäuse (30 pfu) wurden mit anti-IL-17 am Tag 1, 3 und 5 behandelt. Analog dazu wurde den Kontrolltieren Maus-IgG appliziert. Am Tag 3 und 6 p.i. wurden von jeweils vier Tieren die Lungen entnommen. Nach der RNA-Isolation erfolgte der Nachweis der cDNA für das virale Protein M2 mittels quantitativer PCR. Über die Expression des *housekeeping* Gens β -Aktin wurde die relative Expression von M2 ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Expression von M2 der anti-IL-17-behandelten Gruppe \pm SEM ($n = 4$) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Das Experiment wurde mindestens dreimal wiederholt.

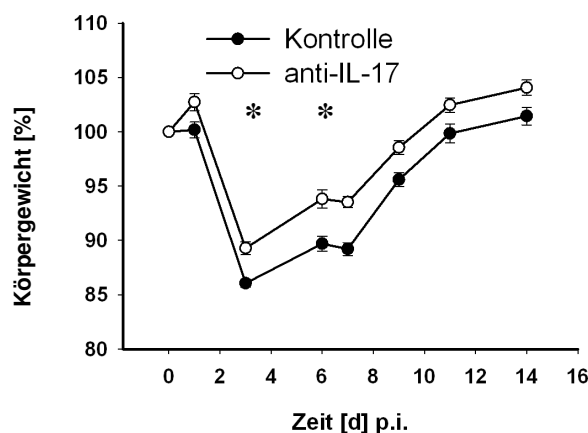


Abb. 31. Auswirkung der IL-17 – Blockade auf das Körpergewicht der Mäuse nach Infektion mit H3N2. Nach i.n. Infektion von C57BL/6 Mäusen mit $5 \cdot 10^4$ pfu A/Hongkong/1/68 (H3N2) wurden diese mit anti-IL-17 bzw. Maus-IgG (= Kontrolle) behandelt. Die Tiere wurden täglich gewogen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Körpermassen in % \pm SEM ($n = 7$). Das Experiment wurde einmal durchgeführt. Die Signifikanz am Tag 2 und 6 ($p < 0,05$ *) wurde mithilfe des Mann-Whitney U-Test ermittelt.

Tab. 13. Effekt der anti-IL-17-Applikation auf die Viruslast in H3N2-infizierten Mäusen. Die H3N2-infizierten C57BL/6 Mäuse ($5 \cdot 10^4$ pfu) wurden mit anti-IL-17 am Tag 1, 3 und 5 behandelt. Analog dazu wurde den Kontrolltieren Maus-IgG appliziert. Am Tag 14 p.i. wurden die Lungen entnommen. Nach der RNA-Isolation erfolgte der Nachweis der cDNA für das virale Protein M2 mittels quantitativer PCR. Dargestellt sind die Mittelwerte der Kopien viraler cDNA/ 0,5 μ g RNA \pm SEM ($n = 7$).

	Kontrolle	anti-IL-17
Kopien viraler cDNA / 0,5 μ g RNA	1452 \pm 636,84	NN

NN = nicht nachweisbar

4.2.2.2. Auswirkung der anti-IL-17-Applikation auf die Infiltration neutrophiler Granulozyten

Eine wichtige Funktion von IL-17 ist die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten. Aus diesem Grund wurde zunächst der Einfluss der IL-17 – Blockade auf die Infiltration neutrophiler Granulozyten in das Lungengewebe untersucht.

Zunächst wurden sowohl im peripheren Blut als auch in der Lunge neutrophile Granulozyten über die Expression von CD11b und GR-1 im Durchflusszytometer identifiziert (Dotplot siehe Abb.21B). Die absolute Anzahl der Neutrophilen in der Lunge wurde über die *frequency of total* und der absoluten Zellzahl der Lunge ermittelt. Wie in Abb.32 zu sehen, kommt es zu einer Reduktion der Frequenz an Neutrophilen im peripheren Blut und zu einer reduzierten Anzahl Neutrophiler in den Lungen Influenzavirus-infizierter Tiere nach IL-17 – Blockade. Dieser Unterschied wird jedoch erst am Tag 7 nach Infektion deutlich (Abb.32).

Neben der Analyse im Durchflusszytometer wurden parallel dazu Paraffinschnitte der Lungen mithilfe eines Neutrophil-spezifischen Antikörpers (Klon 7/4) immunhistochemisch angefärbt. Repräsentative Bilder der Kontroll- und anti-IL-17-behandelten Gruppe am Tag 5 nach Infektion sind in Abb.33 zu sehen. Die 7/4-positiven Zellen sind in Abb.33 an ihrer braunen Färbung zu erkennen. Während in der linken Abbildung, in der Lunge eines Kontrolltieres, eine Vielzahl von 7/4-positiven Zellen zu verzeichnen sind, sind in der rechten Abbildung (anti-IL-17-behandelte Gruppe) keine Neutrophilen nachweisbar.

Somit verringert bzw. verhindert die Behandlung der Influenzavirus-infizierten Mäuse mit anti-IL-17 die Infiltration neutrophiler Granulozyten in das Lungengewebe.

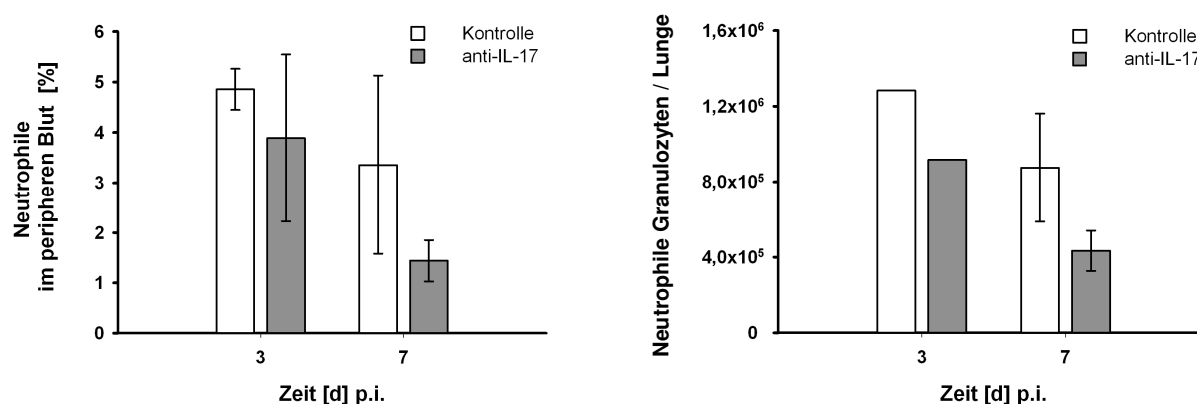


Abb. 32. Neutrophile Granulozyten im peripheren Blut und in der Lunge Influenzavirus-infizierter Mäuse nach IL-17 – Blockade. Nach Infektion von C57BL/6 Mäusen mit 45 pfu H1N1 wurde ein Teil der Tiere mit anti-IL-17 behandelt (300 μ g i.p. am Tag 1, 3 und 5). Den Kontrolltieren wurde analog Maus-IgG injiziert. Zu den entsprechenden Zeitpunkten - Tag 3 und Tag 7 p.i. - wurden jeweils 4 Tiere analysiert. Dabei wurden die Zellen aus dem peripheren Blut und die Leukozyten aus der Lunge mit anti-GR-1 und anti-CD11b zur Identifizierung der neutrophilen Granulozyten gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Für die Zellen des peripheren Blutes sind die *frequency of parent* (bezogen auf die vitalen Zellen) in % gezeigt. Die Anzahl an Neutrophilen in der Lunge wurde mittels *frequency of total* und der absoluten Anzahl an Leukozyten berechnet. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM (n = 4). Für den Zeitpunkt d3 p.i. wurden die Zellen der Lungen aufgrund der geringen Anzahl je Gruppe vereinigt.

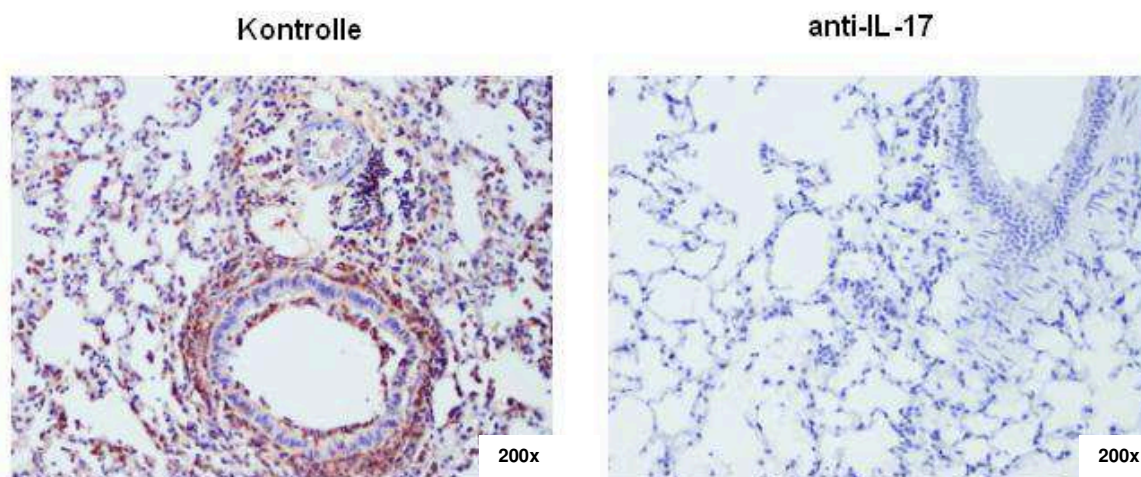


Abb. 33. Anti-IL-17-Applikation verhindert die Infiltration neutrophiler Granulozyten in das Lungengewebe Influenzavirus-infizierter Mäuse. Nach Infektion von C57BL/6 Mäusen mit 45 pfu H1N1 wurde ein Teil der Tiere mit anti-IL-17-behandelt (300 µg i.p. am Tag 1 und 3). Den Kontrolltieren wurde entsprechend Maus-IgG injiziert. Am Tag 5 nach Infektion wurden die Lungen für histologische Untersuchungen entnommen. Die Paraffinschnitte wurden mit einem Neutrophil-spezifischen Marker (Klon 7/4) immunhistochemisch gefärbt. Gezeigt ist ein Lungenausschnitt einer repräsentativen Maus der jeweiligen Gruppe (n = 4).

4.2.2.3. Auswirkung der anti-IL-17-Applikation auf die Immunpathologie

Die Influenzavirus Infektion führt in den Mäusen zunächst zu einer Bronchopneumonie mit massiver Infiltration der Lunge. Zu einem späteren Zeitpunkt führt die Infektion zu einer *Bronchiolitis obliterans* mit einer diffusen Schädigung der Alveolen. Darüber hinaus kommt es zu einer Dedifferenzierung des Epithelgewebes und zu einer lymphoiden Infiltration des Parenchyms als auch der Zellwand der Bronchien. Schließlich verursacht die Infektion eine Fibrose des Parenchyms.

Um zu untersuchen welche Auswirkung die IL-17 – Blockade auf die Zerstörung des Lungengewebes hat, wurden Mäuse mit H1N1 infiziert und anti-IL-17 bzw. Maus-IgG als Kontrolle appliziert. Am Tag 14 nach Infektion wurden die Lungen entnommen und in Paraffin eingebettet. Mit den Paraffinschnitten wurde eine H&E-Färbung durchgeführt. In Abb.34 ist aus jeder Gruppe ein Ausschnitt aus dem Lungengewebe einer repräsentativen Maus im Vergleich zu einem Lungenquerschnitt einer nicht-infizierten Maus zu sehen. Das histologische Bild zeigt eine massive Infiltration in den Lungen der Kontrolltieren. Demgegenüber sind keine Infiltrationen in der Lunge einer naiven Maus zu beobachten. Die anti-IL-17-Applikation verringert die massive Infiltration der Lunge. Neben der Infiltration wurde auch die Pathologie und die Schädigung der Lunge nach Influenzavirus Infektion beurteilt.

Die Ausprägung der *Bronchiolitis obliterans* wurde bewertet und ist in Tab.14 zusammengefasst. Die Blockade von IL-17 verhindert die massive Zerstörung der Lunge (Abb.34) und reduziert den Schweregrad der *Bronchiolitis obliterans* von $2,2 \pm 0,4$ (Kontrolle) auf $0,6 \pm 0,2$ (Tab.14). Die Schädigung der Alveolen ist nach anti-IL-17-Applikation weniger ausgeprägt. Auch das Lungenepithel der anti-IL-17-behandelten Tiere ist weniger zerstört. Demzufolge kommt es zu einer reduzierten Infiltration des Parenchyms. Insgesamt führt also die IL-17 – Blockade bei Influenzavirus-infizierten Mäusen zu einer signifikant reduzierten Schädigung des Lungengewebes.

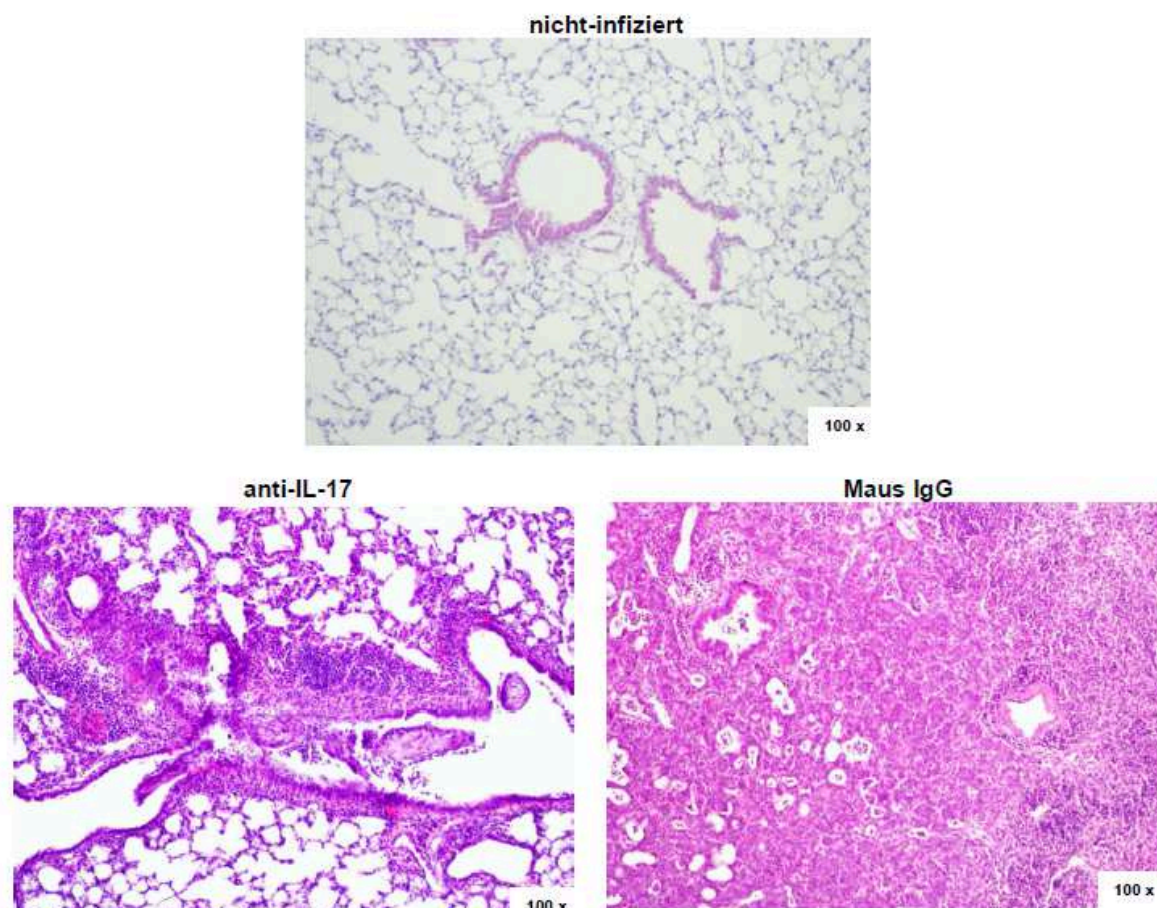


Abb. 34. IL-17 – Blockade reduziert den Schweregrad der *Bronchiolitis obliterans* nach Influenzavirus Infektion. C57BL/6 Mäuse wurden mit 30 pfu H1N1 infiziert. Eine Gruppe der Tiere wurden am Tag 1, 3, 5 und 7 mit je 300 µg anti-IL-17 (Klon MM17F3) behandelt. Der Kontrollgruppe wurde Maus-IgG entsprechend appliziert. Am Tag 14 p.i. wurden die Lungen entnommen, in Paraffin eingebettet und eine H&E-Färbung durchgeführt. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Bild aus der jeweiligen Gruppe (n = 5) im Vergleich zu einer nicht-infizierten Maus. Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

Aufgrund der verminderten Infiltration neutrophiler Granulozyten in das Lungengewebe nach anti-IL-17-Applikation wurden als nächstes neutrophilen Granulozyten in H1N1-infizierten Tieren depletiert. Für die Depletion der Neutrophilen wurden die H1N1-infizierten Mäuse mit anti-GR-1 (Klon RB6-8C5, Isotyp Ratte IgG2b) am Tag 1, 3, 5 und 7 behandelt – analog der anti-IL-17-Applikation. Wie in Abb.35B und Tab.14 zu erkennen ist, reduziert auch die Depletion der Neutrophilen die Schwere der *Bronchiolitis obliterans* ($1,1 \pm 0,1$) und damit die allgemeine Schädigung des Lungengewebes. Jedoch führt die Neutrophilen-Depletion im Vergleich zur Kontrolle nicht zu einem statistisch signifikanten Unterschied der Körpergewichtsreduktion (Abb.35A). Die Depletion neutrophiler Granulozyten wurde im peripheren Blut am Tag 7 p.i. mittels Durchflusszytometrie kontrolliert (Abb.35C). Die neutrophilen Granulozyten wurden dabei über die Oberflächenexpression des Neutrophil-spezifischen Markers, Klon 7/4, und CD11b identifiziert. In Abb.35C ist repräsentativ die *frequency of parent* der Neutrophilen im peripheren Blut einer Maus aus der Kontroll- und anti-IL-17-behandelten Gruppe dargestellt (n = 6). Nach Influenzavirus Infektion sind am Tag 7 19 % neutrophile Granulozyten im peripheren Blut nachweisbar. Durch die

Applikation von anti-GR-1 kommt es zu einer Reduktion der neutrophilen Granulozyten auf 3,23 % im peripheren Blut.

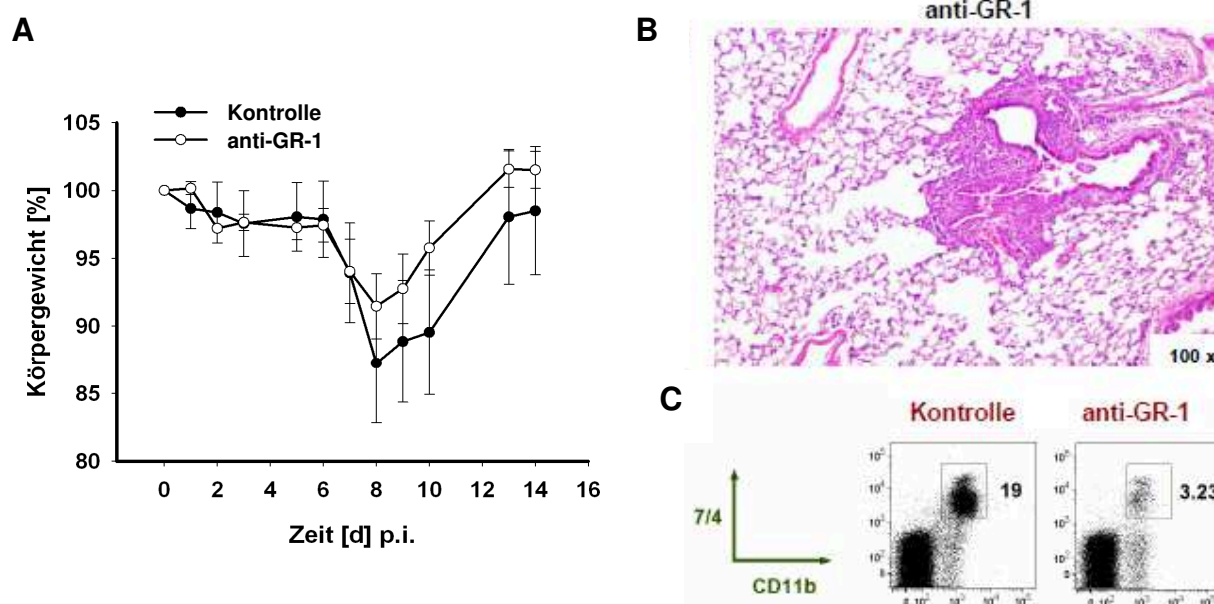


Abb. 35. Depletion neutrophiler Granulozyten in H1N1-infizierten Mäusen. Nach einer sublethalen Infektion von C57BL/6 Mäusen mit H1N1 (30 pfu) wurden den Tieren am Tag 1, 3, 5 und 7 je 300 µg anti-GR-1 (Klon RB6-8C5) injiziert. Den Tieren der Kontrollgruppe wurde kein Antikörper appliziert. **(A)** Die Tiere wurden täglich gewogen. Dargestellt ist der Mittelwert der Körpermassen \pm SEM ($n = 10$ /Gruppe). **(B)** H&E-Färbung am Tag 14 p.i.. Dargestellt ist repräsentativ ein Lungenausschnitt einer anti-GR-1-behandelten Maus von insgesamt 5 analysierten Tieren. **(C)** Die Depletion der neutrophilen Granulozyten wurde mittels FACS-Färbung des peripheren Blutes am Tag 7 p.i. kontrolliert. Das periphere Blut wurde aus den Augen der Tiere gewonnen und auf die Oberflächenexpression des Neutrophil-spezifischen Markers 7/4 und CD11b gefärbt. Dargestellt ist die *frequency of parent* des peripheren Blutes eines repräsentativen Vertreters der Kontroll- und anti-GR-1-behandelten Gruppe.

Tab. 14. Schweregrad der *Bronchiolitis obliterans*. Nach der Infektion von C57BL/6 Mäusen mit 30 pfu H1N1 wurde ein Teil der Tiere am Tag 1, 3, 5 und 7 mit jeweils 300 µg anti-IL-17-behandelt. Einer anderen Gruppe wurde anti-GR-1 (Klon RB6-8C5) analog injiziert, um Neutrophile zu depletieren. Der Kontrollgruppe wurde entsprechend Maus-IgG appliziert. Am Tag 14 p.i. wurden die Lungen entnommen und mit den Paraffinschnitten zur histologischen Untersuchung eine H&E-Färbung durchgeführt. Die Schwere der *Bronchiolitis obliterans* wurde wie folgt bewertet: 0 = keine Bronchiolitis, 1 = milde Bronchiolitis, 2 = normale Bronchiolitis, 3 = stark ausgeprägte Bronchiolitis ($n = 5$ /Gruppe).

Gruppe	Kontrolle	anti-IL-17	anti-GR-1
Schweregrad der <i>Bronchiolitis obliterans</i>	2,2 \pm 0,4	0,6 \pm 0,2	1,1 \pm 0,1

Die Ergebnisse belegen, dass die Applikation des anti-IL-17-Antikörpers zu einem wesentlich milderen Krankheitsverlauf der Influenzavirus-infizierten Mäuse führt – sichtbar am Körpergewicht der Tiere und der stark reduzierten Immunpathologie. Darüber hinaus zeigen die H1N1-infizierten Tiere nach IL-17 –

Blockade eine reduzierte Viruslast und damit eine schnellere Beseitigung des Virus. Durch die Depletion der neutrophilen Granulozyten wird der Schweregrad der *Bronchiolitis obliterans* reduziert.

4.2.2.4. Auswirkung der anti-IL-17-Applikation auf das adaptive Immunsystem nach Influenzavirus Infektion

Neben dem klinischen Verlauf, der Viruslast und der Analyse der Neutrophilen wurde als nächstes die Wirkung der anti-IL-17-Applikation auf das adaptive Immunsystem untersucht. Dabei wurde der Fokus der Analyse auf verschiedene Zellpopulationen sowie deren Zytokinproduktion gelegt. Zusätzlich erfolgte der Nachweis Influenza-spezifischer Antikörper im Serum der Mäuse.

Zunächst wurde jedoch die absolute Zahl an Leukozyten in Lunge und Milz bestimmt (Abb.36). Nach Influenzavirus Infektion kommt es zwischen Tag 4 und Tag 7 zu einem signifikanten Anstieg der Leukozyten in der Lunge der C57BL/6 Mäuse. In der Milz hingegen kommt es zu einer Abnahme der Leukozyten zwischen Tag 4 und Tag 7 nach Infektion. Jedoch führt die IL-17 – Blockade zu keinem signifikanten Unterschied in der Anzahl der Leukozyten, weder in der Lunge noch in der Milz, im Vergleich zur Kontrollgruppe.

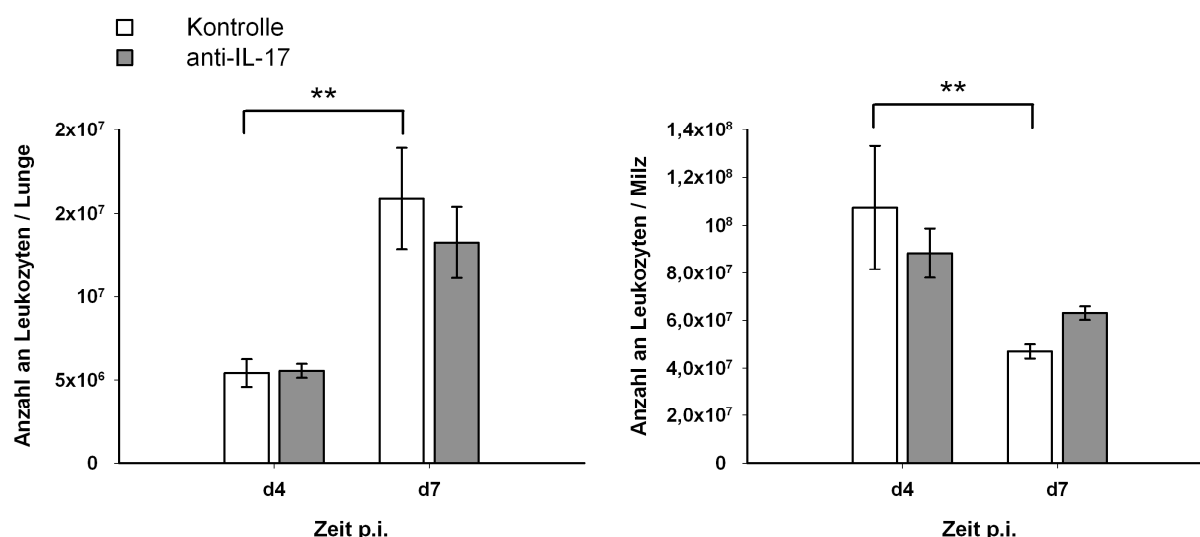


Abb. 36. Zahl der Leukozyten in Lunge und Milz am Tag 4 und 7 nach Influenzavirus Infektion. C57BL/6 Mäuse wurden mit 30 pfu H1N1 i.n. infiziert. Den Tieren wurde am Tag 1, 3 und 5 jeweils 300 µg anti-IL-17 bzw. Maus-IgG (= Kontrolle) appliziert. Am Tag 4 und 7 wurden aus jeder Gruppe drei Tiere analysiert. Nach Isolation der Leukozyten aus der Lunge und der Herstellung einer Einzellellsuspension aus den Milzen wurden die Zellen gezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Leukozytenanzahl \pm SEM ($n = 3/\text{Gruppe}$) der Lunge bzw. der Milz. $p < 0,01$ ** Mann-Whitney U-Test.

Um die Leukozyten genauer charakterisieren wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert. Die Zellen wurden am Tag 7 p.i. mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen CD4, CD8, NK1.1 und $\gamma\delta$ TZR inkubiert. Der Abb.37 ist zu entnehmen, dass am Tag 7 nach Infektion und anti-IL-17-Applikation im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant weniger CD8⁺ T- und NK1.1⁺ Zellen in der Lunge vorhanden sind. Allerdings gibt es keinen deutlichen Unterschied in der Zahl der CD4⁺ T-Zellen sowie der $\gamma\delta$ T-Zellen in der Lunge. Im Gegensatz dazu kommt es in der Milz am Tag 7 p.i. zu einem signifikanten Anstieg der

CD4⁺ T-Zellen in den anti-IL-17-behandelten Tieren. Die Applikation des IL-17-Antikörpers hat jedoch keinen Einfluss auf die Anzahl der CD8⁺ und $\gamma\delta$ T-Zellen sowie NK1.1⁺ Zellen in der Milz.

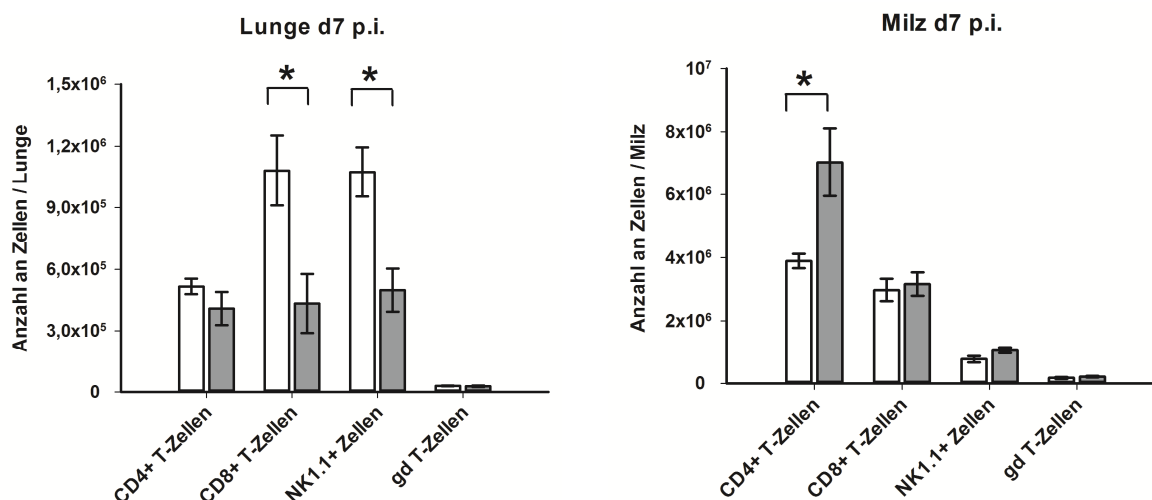


Abb. 37. Zahl der CD4⁺, CD8⁺ und $\gamma\delta$ T-Zellen sowie NK1.1⁺ Zellen in Lunge und Milz am Tag 7 nach Influenzavirus Infektion. Nach Infektion von C57BL/6 Mäusen mit 30 pfu H1N1 wurden die Tiere am Tag 1, 3 und 5 mit je 300 μ g anti-IL-17 bzw. Maus-IgG (= Kontrolle) behandelt. Am Tag 7 nach Infektion wurden die Tiere analysiert. Die Zellen der Lunge und Milz wurden dabei auf CD4, CD8, NK1.1 und dem $\gamma\delta$ TZR gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Die Zellzahl der einzelnen Populationen wurde mithilfe der *frequency of total* und der absoluten Zellzahl der Lunge bzw. Milz berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n = 3/Gruppe). p < 0,05 *, Mann-Whitney U-Test.

Die Zellen des adaptiven Immunsystems sind wichtige Zytokinproduzenten. Deshalb wurde im nächsten Schritt untersucht, ob die anti-IL-17-Applikation in den infizierten Tieren auch einen Einfluss auf die Zytokinproduktion in der Lunge hat (Abb.38). Folgende Zytokine wurden am Tag 7 nach polyklonaler Restimulation in Kombination mit der Oberflächenfärbung auf CD4, CD8, NK1.1 und $\gamma\delta$ TZR mittels intrazellulärer Färbung untersucht: IFN- γ , IL-17 und IL-10. Etwa 20 bis 40 % der untersuchten Zelltypen exprimieren IFN- γ (Abb.38A). Weniger als 5 % der NK1.1⁺ Zellen, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen exprimieren IL-17. Im Gegensatz dazu produzieren in der Lunge etwa 10 bis 15 % der $\gamma\delta$ T-Zellen IL-17. IL-10 wird – ähnlich wie IL-17 – sehr gering von den analysierten Zellpopulationen produziert. Somit exprimieren lediglich 2 % der CD4⁺ bzw. 3 % der CD8⁺ T-Zellen IL-10 in der Lunge. Erst die Kalkulation der absoluten Anzahl der Zytokin-produzierenden Zellen zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen: die IL-17 – Blockade führt zu einer signifikanten Reduktion der IFN- γ -produzierenden CD8⁺ T- und NK1.1⁺-Zellen in den Lungen der Mäuse. Wie in Abb.38B zu sehen ist, hat die IL-17 – Blockade auch Auswirkung auf die IL-17-Expression der $\gamma\delta$ T-Zellen: Es kommt zu einem signifikanten Anstieg der IL-17-produzierenden $\gamma\delta$ T-Zellen nach anti-IL-17-Applikation.

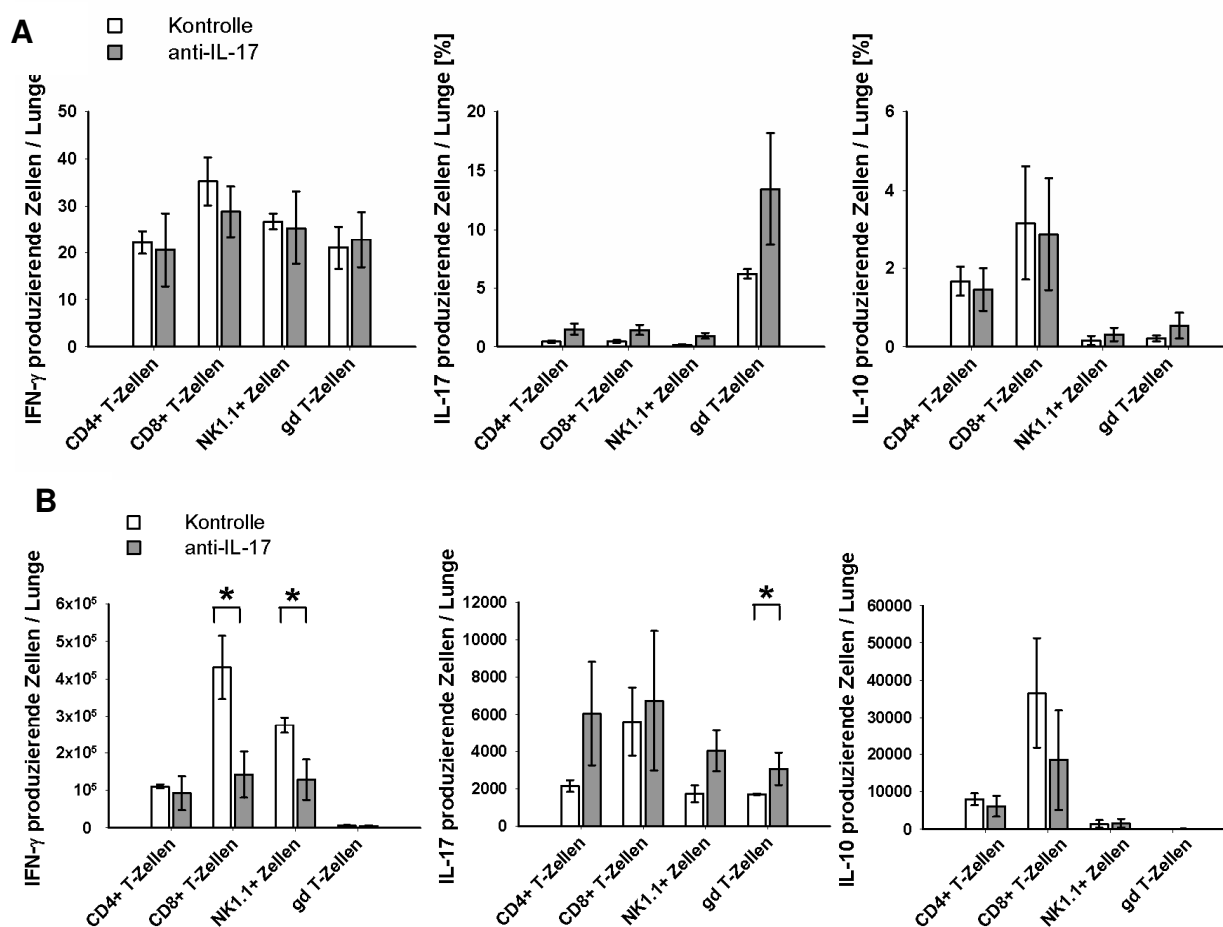


Abb. 38. IFN- γ , IL-17- und IL-10-produzierende CD4⁺, CD8⁺ und $\gamma\delta$ T-Zellen sowie NK1.1⁺ Zellen in der Lunge am Tag 7 p.i. Nach Infektion von C57BL/6 Mäusen mit 30 pfu H1N1 wurden die Tiere am Tag 1, 3 und 5 mit je 300 μ g anti-IL-17 bzw. Maus-IgG (= Kontrolle) behandelt. Am Tag 7 nach Infektion wurden die Lungen entnommen, die Leukozyten isoliert und die Zytokinproduktion analysiert. Die Zellen der Lunge wurden mit PMA und Ionomycin für 4 h restimuliert. Nach Oberflächenfärbung auf CD4, CD8, NK1.1 und dem $\gamma\delta$ TZR und Fixierung der Zellen wurden diese intrazellulär auf die Zytokine IFN- γ , IL-17 und IL-10 gefärbt. Nach Ausschluss der toten Zellen wurden zunächst die Zellpopulationen (CD4⁺, CD8⁺, $\gamma\delta$ T-Zellen und NK1.1⁺ Zellen) eingegrenzt, um schließlich die Zytokinproduktion anzeigen zu lassen. Dargestellt sind die Zytokin-produzierenden Zellen in % als *frequency of parent* (**A**) sowie die Anzahl der Zytokin-produzierenden Zellen pro Lunge (**B**) als Mittelwerte \pm SEM (n = 3/Gruppe). p < 0,05 * Mann-Whitney U-Test. Die Zellzahl der einzelnen Zytokin-produzierenden Populationen wurde mithilfe der *frequency of total* und der absoluten Zellzahl der Lunge berechnet.

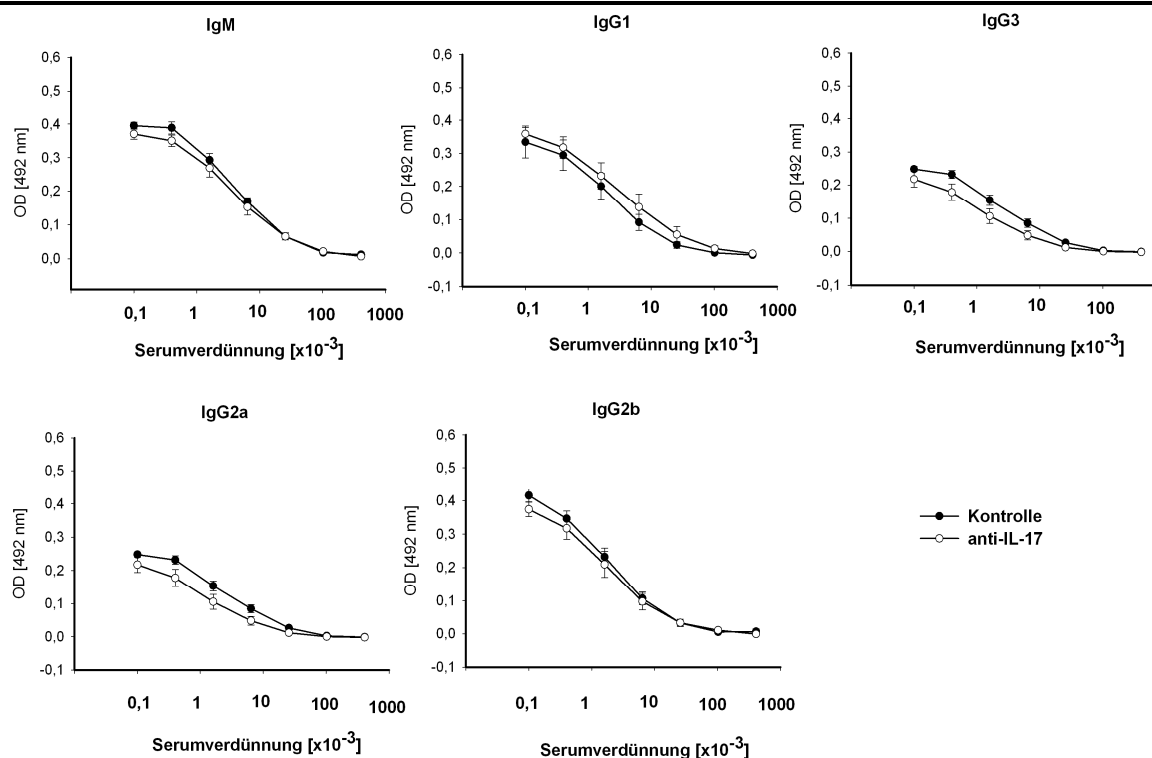


Abb. 39. Nachweis Influenza-spezifischer Antikörper im Serum H1N1-infizierter Mäuse nach IL-17 – Blockade.

Am Tag 14 nach Infektion von C57BL/6 Mäusen mit 30 pfu H1N1 und Applikation von anti-IL-17 bzw. Maus-IgG (= Kontrolle) am Tag 1, 3, 5 und 7 wurde das Serum der Mäuse gewonnen. Die Seren wurden seriell verdünnt und im ELISA auf die Anwesenheit Isotyp-spezifischer anti-Influenza-Antikörper getestet. Aufgetragen sind die OD-Werte (gemessen bei 492 nm) gegen die Serumverdünnung. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der gemessenen OD ($n = 5/\text{Gruppe}$).

Virus-spezifische Antikörper spielen eine wesentliche Rolle bei der Bekämpfung der Influenzaviren nach einer Primärinfektion [200]. Daher wurden auch Influenza-spezifische Antikörper mittels ELISA analysiert (Abb.39). Die Seren der anti-IL-17-behandelten Mäuse sowie der Kontrolltiere wurden am Tag 14 nach Infektion entnommen. Die ELISA Platten wurden mit UV-inaktiviertem H1N1 Virus beschichtet und das Serum in den seriellen Verdünnungsstufen aufgetragen. Mithilfe der Sekundärantikörper konnten die Influenza-spezifischen IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3 Antikörper im Serum der Tiere nachgewiesen werden. In Abb.39 ist zu sehen, dass alle Isotypen im Serum vertreten sind, wobei IgM, IgG1 und IgG2b am häufigsten vorkommen. Allerdings ist zwischen beiden Gruppen (anti-IL-17 und Kontrolle) kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen.

4.2.2.5. Auswirkung der anti-IL-17-Applikation auf das Transkriptom der H1N1-infizierten Mäuse

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die IL-17 – Blockade zu einem mildereren Krankheitsverlauf nach einer Infektion mit H1N1 führt, sollte nach der Analyse der beteiligten Zellpopulationen sowie deren Zytokinproduktion, auch der Unterschied auf Transkriptionsebene untersucht werden.

Für die Genomanalyse mittels Microarray wurden erneut Mäuse mit dem Influenzavirus H1N1 infiziert. Am Tag 1 und 3 nach Infektion wurde den Tieren entweder anti-IL-17 oder Maus-IgG appliziert. Am Tag 2 und 4 wurden je drei Tiere pro Gruppe euthanasiert und die Lungen entnommen. Als Kontrollen dienten nicht-infizierte Mäuse. Nach Isolation der RNA wurde zunächst die Qualität der RNA untersucht. Dafür

wurden die Proben auf ein RNA-Gel aufgetragen, um die Banden der intakten 18S- und 28S-rRNA zu visualisieren. Alle Proben zeigten intakte 18S- und 28S-rRNA (Abb.40).

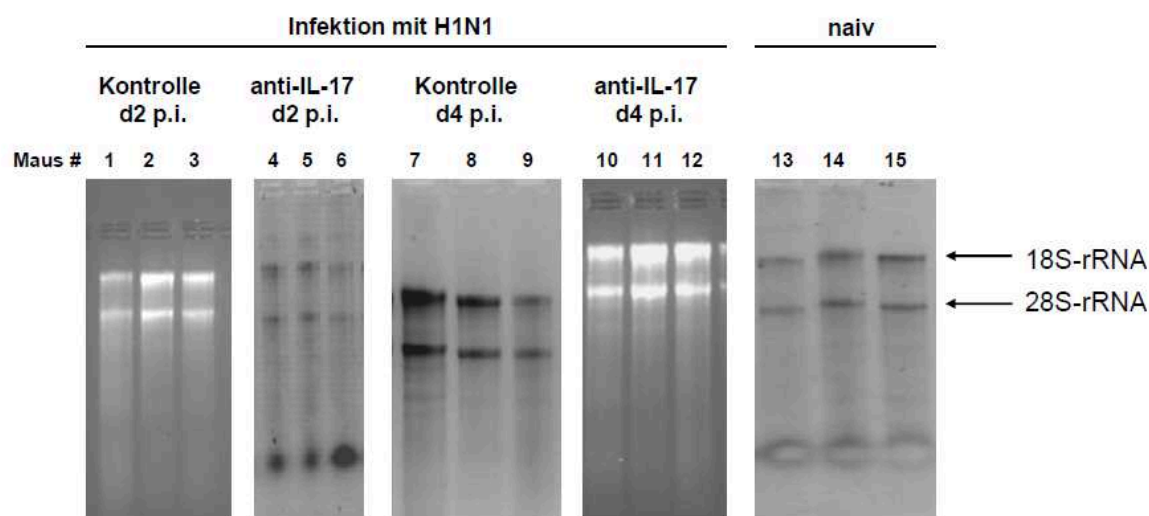


Abb. 40. Qualitätskontrolle der isolierten RNA anhand der Visualisierung der 18S- und 28S-rRNA. Nach der Homogenisierung des Lungengewebes wurde mithilfe des RNeasy Minikits die Gesamt-RNA isoliert. Nach Konzentrationsbestimmung wurden die Proben auf ein RNA-Gel aufgetragen um die Qualität der Gesamt-RNA über den Nachweis der 18S- und 28S-rRNA zu überprüfen.

Zusätzlich geben die Quotienten aus den Absorptionswellenlängen bei 230, 260 und 280 nm, $A_{260/280}$ und $A_{260/230}$, Aufschluss über die RNA-Qualität. Der Quotient 260/280 ($A_{260/280}$) der in dieser Arbeit aufgereinigten RNA-Proben ist gekennzeichnet von durchschnittlichen Werten $> 2,0$. Der Quotienten $A_{260/230}$ der einzelnen Proben zeigen Werte zwischen 1,3 und 2,3.

Aufgrund der Qualitätskontrollen wurde die RNA für die transkriptionelle Analyse im Microarray eingesetzt.

4.2.2.5.1. Qualitätskontrolle und Normalisierung der Microarrays

Die Microarrays wurden von Markus Bläss (Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Universitätsklinikum Jena), die Qualitätskontrolle und die Normalisierung der Microarrays von Dr. Matthias Kohl (Paul-Martini Sepsis Forschungsgruppe; Universitätsklinikum Jena) durchgeführt.

Bevor die Microarrays ausgewertet werden können, müssen bestimmte Qualitätskontrollen vorgenommen werden. Dabei wird zwischen interner und externer Qualitätskontrolle unterschieden.

Die internen Qualitätskontrollen der Microarrays (probenabhängige und probenunabhängige Kontrollen) wurden mithilfe der Software *Bead Studio* (v.3.23.) nach Herstellerangaben durchgeführt (Illumina Systems and Software 2005. *BeadStudio Users Guide*. Data Analysis Software for Use with Illumina Gene Expression Products. Doc. #11179632 Rev.B.). Hierbei zeigte sich durchweg eine gute bis sehr gute Qualität des Probenmaterials, der Hybridisierung sowie der Vorverarbeitung.

Die externe Qualitätskontrolle beinhaltet sowohl die Überprüfung der Anzahl an *Beads* pro *Beadtyp* als auch die Ähnlichkeitsanalysen und die Normalisierung. Ein Qualitätsmerkmal der *Bead Chips* ist die Anzahl der *Beads* pro *Beadtyp*. Die Qualität ist gewährleistet, wenn pro Replikat mindestens fünf *Beads*

vorhanden sind. Alle *Bead*typen sind mit mehr als 10 Replikaten vertreten. Dieses Ergebnis spricht für eine gute Qualität der *Bead Chips*.

Als nächstes wurde die Ähnlichkeit der *BeadArrays* erfasst. Diese wurde mit sogenannten Ähnlichkeitsmatrizen (*Similarity Matrices*) untersucht. Dieser Vorgang ist notwendig, um *Batch*-Effekte, die aufgrund der Probenaufbereitung entstehen sein könnten, innerhalb des Experiments zu detektieren. Für die Normalisierung wurden zunächst alle *Bead*typen verwendet und die Expressionwerte (Signalintensitäten) zur Basis 2 logarithmiert. Dafür wurden die *BeadArrays* nach den experimentellen Gruppen sortiert und die Ähnlichkeit mittels des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman ermittelt. Der Rangkorrelationskoeffizient ist ein parameterfreies Maß für die Korrelation und ist robust gegenüber Ausreißern. Die Ähnlichkeitsanalyse deutete auf keine *Batch*-Effekte hin, die auf systematische Fehler durch die Probenaufbereitung und verwendeten Materialien hervorgerufen werden könnten. Die Ähnlichkeitsanalyse wurde mit den detektierten *Bead*typen wiederholt. Als detektierte *Bead*typen wurden diese identifiziert und auch für die späteren statistischen Analysen ausgewählt, welche bei mindestens zwei *BeadArrays* einen Detektions p-Wert $< 0,01$ aufwiesen. Das sind in diesem Fall 22.310 detektierte Transkripte bzw. *Bead*typen pro Lunge. Um systemische Variationen zu minimieren wurden die Daten normalisiert und die Ähnlichkeitsanalysen für die normalisierten Daten mittels Rangkorrelationskoeffizienten nach Pearson wiederholt.

4.2.2.5.2. Statistische Analysen und biologische Zusammenhänge

Die statistische Varianzanalyse wurde mithilfe des parametrischen Testverfahrens *Welch modification of one-way ANOVA* durchgeführt.

Aufgrund der geringen Anzahl an Replikaten ($n = 3$) wurde zum Vergleich der Expressionsveränderungen innerhalb der Gruppen die logarithmische Veränderung der Signalintensität zur Basis zwei (\log_2FC) sowie AUC (*area under the curve*) dargestellt. Nach Ermittlung der Mediane der logarithmierten Signale (\log_2FC) biologischer Replikate pro Gen wurden diese in die Software eingelesen.

In sogenannten Schnittmengendiagrammen oder Venn-Diagrammen sollte zunächst die Anzahl der unterschiedlich exprimierten Gene in den Lungen der einzelnen Gruppen dargestellt werden. Mithilfe von Venn-Diagrammen ist es möglich, Gemeinsamkeiten und Unterschiede bezüglich signifikant regulierter Gene zu vergleichenden Datensätzen in Form von Mengen und Schnittmengen darzustellen. Es erfolgte eine Filterung der Gene über ein \log_2FC -Kriterium ($|\log_2FC| > 1$). Das bedeutet, dass nur diejenigen Gene in die weitere Darstellung mittels Venn-Diagramm eingingen, welche mindestens eine zweifache Expressionsveränderung aufzeigten. Dabei sollte als erstes nur analysiert werden, wieviel Gene unterschiedlich stark exprimiert werden – unabhängig davon, ob diese jeweils hoch- oder herunterreguliert werden.

Der Fokus der Analyse wurde zunächst auf folgende Gruppen beschränkt: „naiv vs. Kontrolle d2 vs. Kontrolle d4“ und „naiv vs. anti-IL-17 d2 vs. anti-IL-17 d4“ (Abb.41). Dabei bedeutet „naiv vs. Kontrolle d2 vs. Kontrolle d4“ der Vergleich zwischen naiven Mäusen, H1N1-infizierten Mäusen am Tag 2 p.i. und H1N1-infizierten Mäusen am Tag 4 p.i.. Analog dazu wurden naive Mäuse, H1N1-infizierte anti-IL-17-behandelte Mäuse am Tag 2 und H1N1-infizierte anti-IL-17-behandelte Mäuse am Tag 4 p.i. („naiv vs. anti-IL-17 d2 vs. anti-IL-17 d4“) verglichen. In die Analysen wurden lediglich *Bead*typen mit den Werten $AUC > 0,88$ und $|\log_2FC| > 1$ einbezogen.

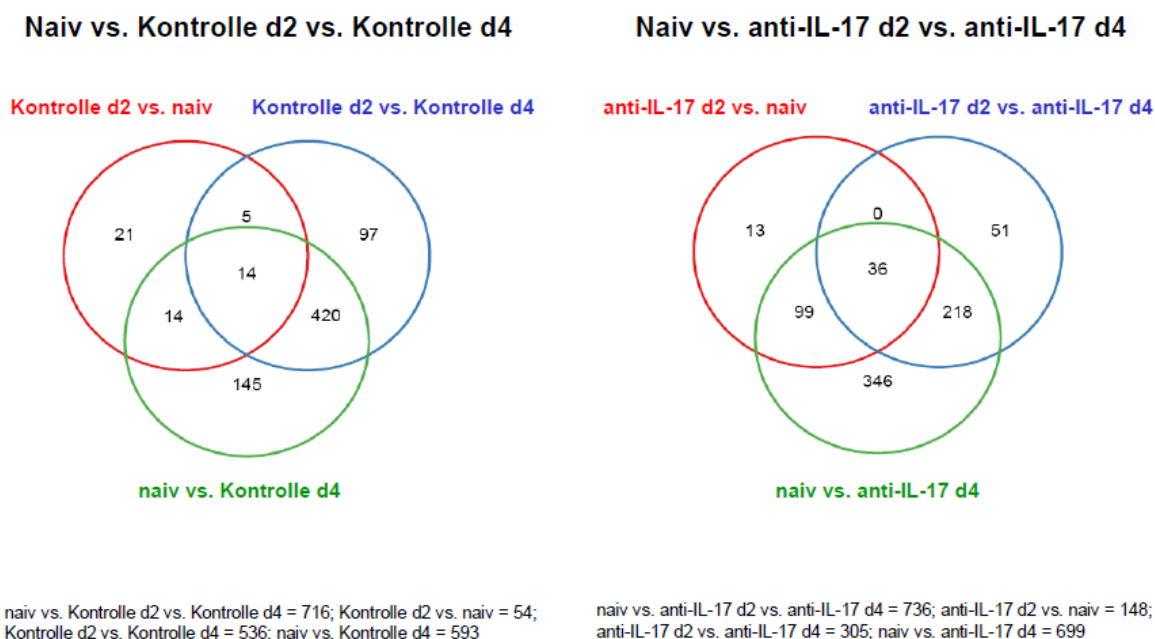


Abb. 41. Venn-Diagramme der Lunge nach H1N1-Infektion (Kontrolle und anti-IL-17-Applikation). Dargestellt ist die Anzahl der signifikant exprimierten Gene ($AUC > 0,88$; $|\log_2 FC| > 1$) in Form von Mengen und Schnittmengen im Vergleich zwischen „naiv vs. Kontrolle d2 vs. Kontrolle d4“ (linke Abb.) sowie „naiv vs. anti-IL-17 d2 vs. anti-IL-17 d4“ (rechte Abb.).

Zunächst konnte festgestellt werden, dass im Vergleich zwischen „naiv vs. Kontrolle d2 vs. Kontrolle d4“ und „naiv vs. anti-IL-17 d2 vs. anti-IL-17 d4“ 716 bzw. 736 Gene hoch- bzw. herunterreguliert werden (Abb.41). Während in der Gegenüberstellung von „naiv und anti-IL-17 d2“ 148 Gene herauf- oder herunterreguliert werden, konnten zwischen „naiv und Kontrolle d2“ lediglich 54 Gene detektiert werden, die entsprechend reguliert werden. Im Verlauf der Infektion von d2 auf d4 sind in der Kontrollgruppe 536 Gene unterschiedlich stark reguliert. Dem gegenüber werden in der anti-IL-17-behandelten Gruppe 305 Gene signifikant reguliert. Die Venn-Diagramme zeigen somit, dass - wie zu erwarten - auf Transkriptomebene nach H1N1-Infektion eine Vielzahl an Genen signifikant hoch- bzw. herunterreguliert werden. Bei der getrennten Begutachtung der Gruppen, d.h. „naiv vs. Kontrolle d2 vs. Kontrolle d4“ und „naiv vs. anti-IL-17 d2 vs. anti-IL-17 d4“, wird bereits deutlich, dass die anti-IL-17-Applikation einen bedeutenden Einfluss auf das Transkriptom hat. So werden im Vergleich zwischen „naiv vs. anti-IL-17 d2“ 148 Gene und im Vergleich zwischen „naiv vs. Kontrolle d2“ lediglich 54 Gene signifikant hoch- bzw. herunterreguliert.

Um diesen Unterschied zu verdeutlichen wurde in einem nächsten Schritt die Kontroll- und anti-IL-17-behandelte Gruppe am Tag 2 und Tag 4 direkt miteinander verglichen (Abb.42). Die Gegenüberstellung „Kontrolle vs. anti-IL-17“ am Tag 2 zeigt mit 37 signifikant regulierten Genen mehr Unterschiede auf als „Kontrolle vs. anti-IL-17“ am Tag 4 mit 17 unterschiedlich regulierten Genen. Dieses Ergebnis zeigt, dass die anti-IL-17-Applikation bereits zum frühen Zeitpunkt - am Tag 2 nach Infektion - einen Einfluss auf das Transkriptom der Lungenzellen der H1N1-infizierten Tiere hat. Aus diesem Grund wurde im Folgenden der Hauptfokus der Analyse auf den Zeitpunkt Tag 2 nach Infektion gelegt.

Kontrolle d2 vs. anti-IL-17 d2

Kontrolle d4 vs. anti-IL-17 d4

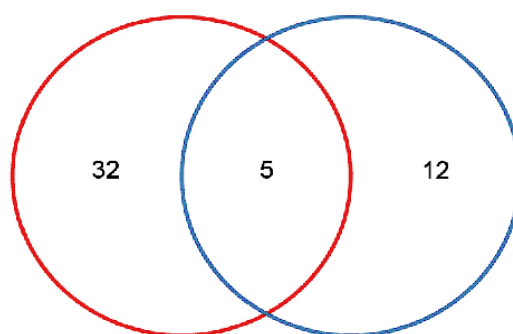


Abb. 42. Venn-Diagramm der Lunge der Kontroll- und der anti-IL-17-behandelten H1N1-infizierten Tiere.

Dargestellt ist die Anzahl der signifikant exprimierten Gene ($AUC > 0,88$; $|\log_2 FC| > 1$) in Form von Mengen und Schnittmengen im Vergleich zwischen „Kontrolle d2 vs. anti-IL-17 d2“ sowie „Kontrolle d4 vs. anti-IL-17 d4“.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass in den beiden zu vergleichenden Gruppen eine Anzahl von Genen unterschiedlich stark exprimiert werden, wurden als nächstes die Gene identifiziert und deren Funktionen und Bedeutung in biologischen Signalwegen charakterisiert. Hierfür steht ein kommerziell erhältliches Programm mit der Bezeichnung Ingenuity (*Ingenuity Systems*®, www.ingenuity.com) zur Verfügung.

Tab. 15. Top Canonical Pathways in der Lunge im direkten Vergleich zwischen der Kontrollgruppe (Maus-IgG) und der anti-IL-17-behandelte Gruppe am Tag 2 nach Infektion. Unterschiedlich ausgeprägte Expression von Genen, die in definierte Signalwege einbezogen sind, in der Kontrollgruppe und anti-IL-17-behandelten Gruppe am Tag 2 nach Infektion mit H1N1. Verhältnis = Quotient aus Anzahl der Gene aus dem Datenset die in den Signalwegen vertreten sind und die absolute Anzahl an Genen, die zu den jeweiligen Signalwegen zählen. Für die Kalkulation der p-Werte wurde der *Fisher's exact test* verwendet.

Ingenuity Top Canonical Pathways	p-Wert	Verhältnis
Huntington's Disease Signaling	0,000594	0,021
IL-15 Production	0,00315	0,067
Role of Hypercytokinemia/hyperchemokine-mia in the Pathogenesis of Influenza	0,00369	0,044
Interferon Signaling	0,00369	0,067
Role of Cytokines in Mediating Communication between Immune Cells	0,00699	0,036

In der Zusammenfassung der Analyse von Ingenuity wird ein Überblick der sogenannten *Top Canonical Pathways* gegeben (Tab.15). Dabei werden die auffällig regulierten Gene mit den entsprechenden p-Werten bestimmten Signalwegen zugeordnet. Diese Signalwege sowie die zugeordneten Gene sind durch Ingenuity definiert. Das Verhältnis sagt aus, wieviel Gene aus dem Datenset des Signalweges im Vergleich zu der absoluten Anzahl der Gene, die zu dem entsprechenden Signalweg zählen, vertreten sind. Die Tabelle 15 zeigt, dass im direkten Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und den anti-IL-17-behandelten Tieren am Tag 2 p.i. Gene exprimiert werden, die in vielfältige Signalwege einbezogen sind.

Darunter fallen auch Signalwege, die in viralen Infektionen eine Rolle spielen wie z.B. „*Role of Hypercytokinemia/hyperchemokine in the Pathogenesis of Influenza*“ oder „*Interferon Signaling*“.

Die Auflistung der Ingenuity *Top Canonical Pathways* gibt jedoch noch keinen Aufschluss über die einzelnen Gene. Um als nächstes also die einzelnen Gene zu betrachten, ist es möglich mittels Ingenuity die *Top Molecules* anzeigen zu lassen. In den Tabellen 16 und 17 sind nur die Gene gelistet, die in den infizierten Tieren nach anti-IL-17-Applikation im Vergleich zu der Influenzavirus-infizierten Kontrollgruppe mit einem *Expression Value* $> |0,5|$ hoch- bzw. herunterreguliert sind. Aus den Tabellen 16 und 17 ist zu entnehmen, dass in der anti-IL-17-behandelten Gruppe im direkten Vergleich zur Kontrollgruppe mehr Gene hoch- als herunterreguliert werden. Die grau-unterlegten Gene sind dabei mit einem *Expression Value* $> |1|$ besonders auffällig. Mit einem *Expression Value* $> |1|$ werden folgende Gene in der anti-IL-17-behandelten Gruppe im Vergleich zu den Kontrolltieren verstärkt exprimiert: *Heat Shock 70 kDa protein 1A* (HSPA1A), *Interferon-induced protein 35* (IFI35), *Interferon-induced transmembran protein 3* (IFITM3), *Tissue inhibitor of metalloproteinases 1* (TIMP1) und *Ubiquitin specific peptidase 18* (USP 18). Zwei dieser fünf Gene, IFI35 und IFITM3, besitzen eine wichtige Funktion in der Abwehr viraler Infektionen. Das IFITM Protein als antiviraler Faktor vermittelt die angeborene Immunantwort sowohl in der Bekämpfung pathogener Influenza A Virusstämme als auch des West Nil Virus und Dengue Virus [201]. IFI35 kodiert für das *interferon-induced protein 35* (IFI35).

Die Genomanalyse mittels Microarray zeigt auf, dass nur wenig Unterschiede auf Transkriptionsebene zwischen den H1N1-infizierten anti-IL-17-behandelten Tieren und der H1N1-infizierten Kontrollgruppe vorhanden sind. Dabei ist auffallend, dass am Tag 2 nach Infektion mehr Gene unterschiedlich stark exprimiert werden als am Tag 4. Somit scheint der frühe Zeitpunkt der Infektion für den Verlauf der Infektion relevant zu sein. Die Analyse der *Top Molecules* zeigt auf, dass in der anti-IL-17-behandelten Gruppe Gene vermehrt exprimiert werden, die im IFN-Signalweg sowie in der Immunantwort gegen Virusinfektionen eine entscheidende Rolle spielen.

Tab. 16. Verstärkte Expression von Genen im direkten Vergleich zwischen „Kontrolle d2 vs. anti-IL-17 d2“.

Aufgelistet sind die Gene, die in den anti-IL-17-behandelten Tieren im Vergleich zu den Kontrollen am Tag 2 nach Infektion mit einem *Expression Value* > |0,5| hochreguliert sind. Zusätzlich beinhaltet die Tabelle neben dem Symbol, den vollständigen Namen des zugehörigen Proteins, die Bezeichnung des Gens sowie die Lokalisation und den Typ des Proteins.

Symbol	Entrez Gene Name	Gene	Exp. Value	Location	Type(s)
AXL	AXL receptor tyrosine kinase	Axl	0,667	Plasmamembran	Kinase
BMP6	Bone morphogenetic protein 6		0,692	Extrazellulärer Raum	Knochenwachstumsfaktor
CCDN2	Cyclin D2	Ccdn2	0,521	Nukleus	
CLDN15	Claudin 15	Cldn15	0,575	Plasmamembran	Transmembranrezeptor
CLIC4	Chloride intracellular channel 4	Clic4	0,639	Zytoplasma	Ionenkanal
CREM	CAMP responsive element modulator	Crem	0,734	Nukleus	Transkriptionsregulator
DLL1	Delta-like 1 (Drosophila)	Dll1	0,752	Plasmamembran	Enzym
DNAJB1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1	Dnajb1	0,700	Nukleus	
HSPA8	Heat shock 70 kDa protein 8	Hspa8	0,558	Zytoplasma	Enzym
HSPA1A	Heat shock 70 kDa protein 1A	Hspa1a	1,071	Zytoplasma	
IFI35	Interferon-induced protein 35	Ifi35	1,509	Nukleus	
IFITM3	Interferon induced transmembran protein 3	Ifitm35	1,080	Plasmamembran	
IL-15	Interleukin 15	Il15	0,511	Extrazellulärer Raum	Zytokin
KRT17	Keratin 17	Krt17	0,587	Zytoplasma	
PPRC1	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator-related 1	Pprc1	0,688	Extrazellulärer Raum	
SNCA	Synuclein, alpha (non A4 component of amyloid precursor)	Snca	0,799	Zytoplasma	
TIMP1	TIMP metalloproteinase inhibitor 1	Timp1	2,686	Extrazellulärer Raum	
TRA2A	Transformer 2 alpha homolog (Drosophila)	Tra2a	0,683	Nukleus	
USP18	Ubiquitin specific peptidase 18	Usp18	1,716	Plasmamembran	

Tab. 17. Reduzierte Expression von Genen im direkten Vergleich zwischen „Kontrolle d2 vs. anti-IL-17 d2“.

Aufgelistet sind die Gene, die in den anti-IL-17-behandelten Tieren im Vergleich zu den Kontrollen am Tag 2 nach Infektion mit einem *Expression Value* > |0,5| herunterreguliert sind. Zusätzlich beinhaltet die Tabelle neben dem Symbol, den vollständigen Namen des zugehörigen Proteins, die Bezeichnung des Gens sowie die Lokalisation und den Typ des Proteins.

Symbol	Entrez Gene Name	Gene	Exp. Value	Location	Type(s)
ALOX12	Arachidonate 12-lipoxygenase	Alox12	0,721	Zytoplasma	Enzym
CLDN4	Claudin 4	Cldn4	0,509	Plasmamembran	
CYP2E1	Cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1	Cyp2e1	0,868	Zytoplasma	Enzym
GP5	Glycoprotein V	Gp5	0,752	Plasmamembran	
GP9	Glycoprotein IX	Gp9	0,806	Plasmamembran	
HMGCS2	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2 (mitochondrial)	Hmgcs2	1,081	Zytoplasma	Enzym
SKI	V-ski sarcoma viral oncogene homolog (avian)	Ski	0,622	Nukleus	
SPAG6	Sperm associated antigen 16		1,153	Zytoplasma	
THSD4	thrombospondin, type I, domain containing 4	Thsd4	1,286	unbekannt	
TREML1	Triggering receptor expressed on myeloid cells-like 1	Treml1	0,825	Plasmamembran	

4.2.3. Influenzavirus Infektion in IL17 *knockout* Mäusen

Um die Rolle von IL-17 im Influenzavirus Infektionsmodell weiter zu untersuchen, wurden auch C57BL/6_IL-17 *knockout* (ko) Mäuse infiziert und analysiert [84]. Diese Mäuse haben einen Defekt in der Expression von IL-17A. Zunächst sollte der Krankheitsverlauf (Körpergewicht und Überleben) analysiert werden (Abb.43). Im Vergleich zu den Kontrolltieren zeigen die IL-17 ko Mäuse einen ähnlichen Krankheitsverlauf. Dies äußert sich in einem Gewichtsverlust der Tiere und in einer hohen Mortalität. Sowohl in WT als auch in den IL-17-defizienten Tieren ist ein Gewichtsverlust bis zu 30 % ihres ursprünglichen Körpergewichts zu beobachten. Am Tag 7 bis 8 nach Infektion ist das minimale Körpergewicht erreicht. Am Tag 7 nach Infektion ist zusätzlich eine Mortalität von 20 % in beiden Gruppen festzustellen. Bis Tag 9 nach Infektion überleben 60 % der Tiere in beiden Gruppen. Am Tag 13 steigt die Mortalität in den IL-17-defizienten Mäusen auf 80 %, während 60 % der WT Tiere überleben.

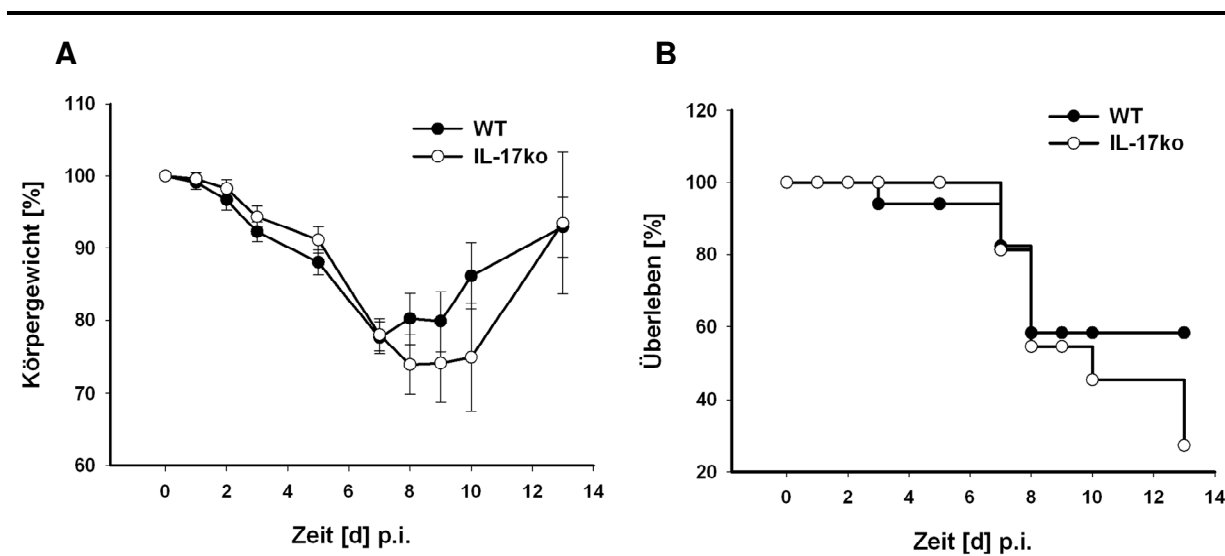


Abb. 43. Krankheitsverlauf in C57BL/6_IL-17 ko Mäusen nach Influenzavirus Infektion. C57BL/6_IL-17 ko und C57BL/6 WT Tiere wurden mit 45 pfu H1N1 i.n. infiziert. Die Tiere wurden regelmäßig gewogen. Dargestellt ist der Mittelwert der individuellen Körpermassen in % ($n = 15/\text{Gruppe}$) \pm SEM (**A**) sowie die Überlebensrate in % (**B**). Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

Am Tag 6 nach Infektion der C57BL/6_IL-17 ko Mäuse wurden Lungen für histologische bzw. immunhistochemische Untersuchungen entnommen (Abb.44). Die H&E-Färbung der Paraffinschnitte am Tag 6 nach Infektion zeigen – ähnlich den Wildtyptieren - eine stark ausgeprägte Infiltration der Lunge. Überraschenderweise ist auch in der Immunhistofärbung mit dem Neutrophil-spezifischen Antikörper, Klon 7/4, eine große Anzahl an Neutrophilen in den Lungen der H1N1-infizierten IL-17 ko Mäusen zu erkennen. Somit sind in den Lungen-Paraffinschnitten der WT Tiere als auch der IL-17-defizienten Tiere eine Vielzahl 7/4-positiver Zellen zu detektieren.

Demzufolge führt die Influenzavirus Infektion von C57BL/6_IL-17 ko Mäusen nicht zu einem milderen Krankheitsverlauf. Darüber hinaus ist in diesen Tieren, ähnlich wie in Influenzavirus-infizierten WT Mäusen, eine Infiltration neutrophiler Granulozyten der Lunge am Tag 6 p.i. nachweisbar.

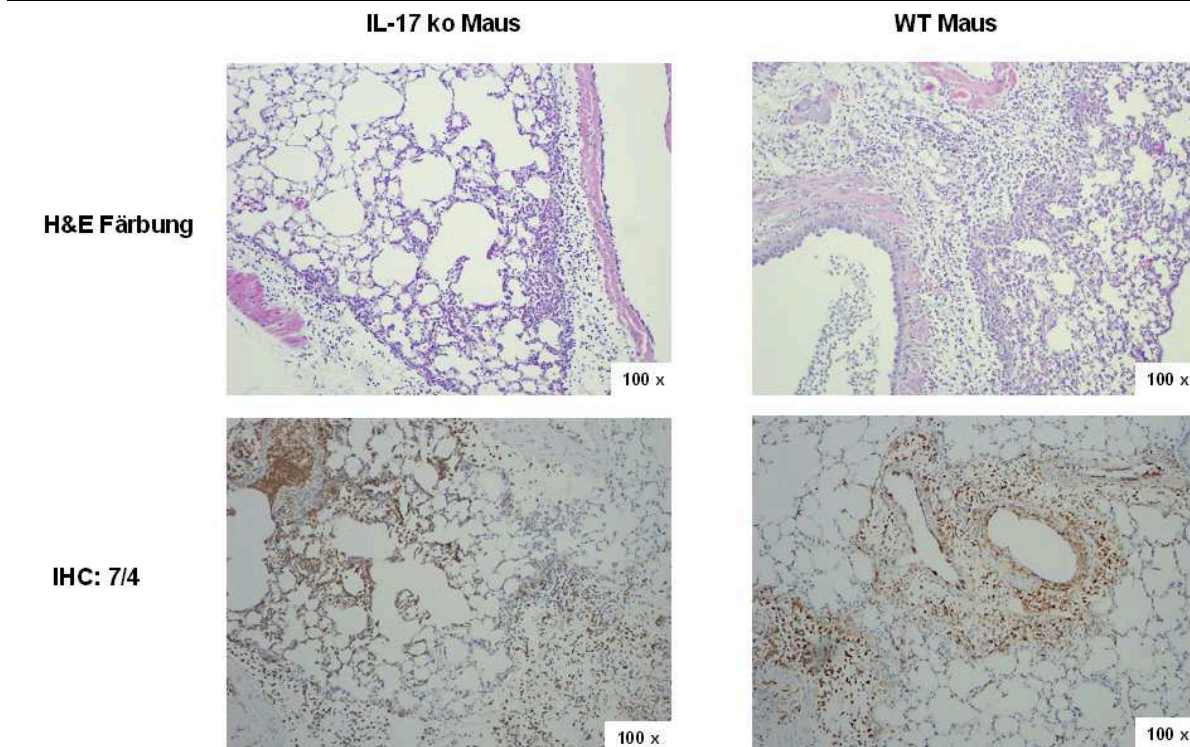


Abb. 44. Infiltration der Lunge in H1N1-infizierten C57BL/6_IL-17 ko Mäusen. C57BL/6_IL-17 ko und C57BL/6 WT Tiere wurden mit 45 pfu H1N1 i.n. infiziert. Am Tag 6 nach Infektion wurden die Lungen für immunhistologische Untersuchungen entnommen. Neben der H&E-Färbung wurden auch Neutrophile mithilfe eines Neutrophil-spezifischen Antikörper (Klon 7/4) immunhistochemisch nachgewiesen. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Bild der IL-17 ko bzw WT Mäuse (n = 5/Gruppe).

4.2.4. Auswirkung der anti-IL-17-Applikation auf eine sekundär bakterielle Infektion

Unter physiologischen Bedingungen führt nicht die Influenzavirus Infektion selbst zu einer hohen Mortalität, sondern meist wird dies durch die sekundäre bakterielle Infektion, z.B. mit *Streptococcus pneumoniae*, ausgelöst, welche tödlich verlaufen kann.

Aus diesem Grund wurde eine Doppelinfektion in C57BL/6 Mäusen mit Influenzavirus und *S.pneumoniae* (Serotyp 3, Stamm NCTC7978) in Kooperation mit Dr. Martin Witzenrath und Katrin Reppe an der Charité in Berlin durchgeführt. Aufgrund der starken Schädigung der Lunge nach einer sekundär bakteriellen Infektion und die damit verbundenen hohen Mortalitäten der Tiere [202, 203] sollten zunächst in einem Vorexperiment die optimalen Infektionsdosen für die Doppelinfektion ermittelt werden. Um die adaptive Immunantwort der Tiere nach der sekundären Infektion mit *S.pneumoniae* untersuchen zu können, ist es notwendig, dass die Tiere diese Infektion mindestens 48 h überleben. Somit wurden C57BL/6 Mäuse mit einer sublethalen Dosis H1N1 (30 pfu) und am Tag 5 nach der Primärinfektion mit 2 unterschiedlich hohen Infektionsdosen *S.pneumoniae* ($1,5 \cdot 10^5$ bzw. $7,5 \cdot 10^4$ PN36) infiziert. Aufgrund der Erfahrungen von Dr. Martin Witzenrath und Katrin Reppe mit diesem Infektionsmodell ist bekannt, dass diese *S.pneumoniae* Infektionsdosen sehr niedrig sind und im Falle einer Einzelinfektion als eine mittlere letale Dosis (LD_{50}) charakterisiert sind. Im Laufe der Erkrankung nach der Primärinfektion als auch der Sekundärinfektion wurden die Tiere täglich begutachtet. Die Körpermasse sowie die –temperatur der Tiere wurden aller 24 h bzw. nach der Sekundärinfektion aller 12 h gemessen. Wie in Abb.45A zu sehen ist, führt die Doppelinfektion mit H1N1 und den zwei unterschiedlich hohen Infektionsdosen

S.pneumoniae zu einer Mortalität von 100 %. Bereits am Tag 2 nach der Sekundärinfektion sterben mehr als 70 % der Tiere. Die Reduktion der Körpermasse um 15 % ist schon nach der Primärinfektion mit dem Influenzavirus zu verzeichnen. Am Tag 7 nach Infektion mit H1N1 bzw. Tag 2 nach Infektion mit *S.pneumoniae* haben die Tiere im Schnitt 30 % ihres ursprünglichen Körpergewichts verloren. Die Körpertemperatur nach der Influenzavirusinfektion ist konstant und sinkt maximal um 1°C. Hingegen resultiert die Sekundärinfektion in einer Abnahme der Körpertemperatur der Mäuse von ca. 37 auf 30°C (Abb.45B).

Aufgrund der Vorexperimente wurden für die weiteren Experimente sehr niedrige Infektionsdosen von 10 pfu H1N1 und am Tag 5 mit $1 \cdot 10^4$ PN36 verwendet, um das Überleben der Tiere nach der Sekundärinfektion zu erhöhen.

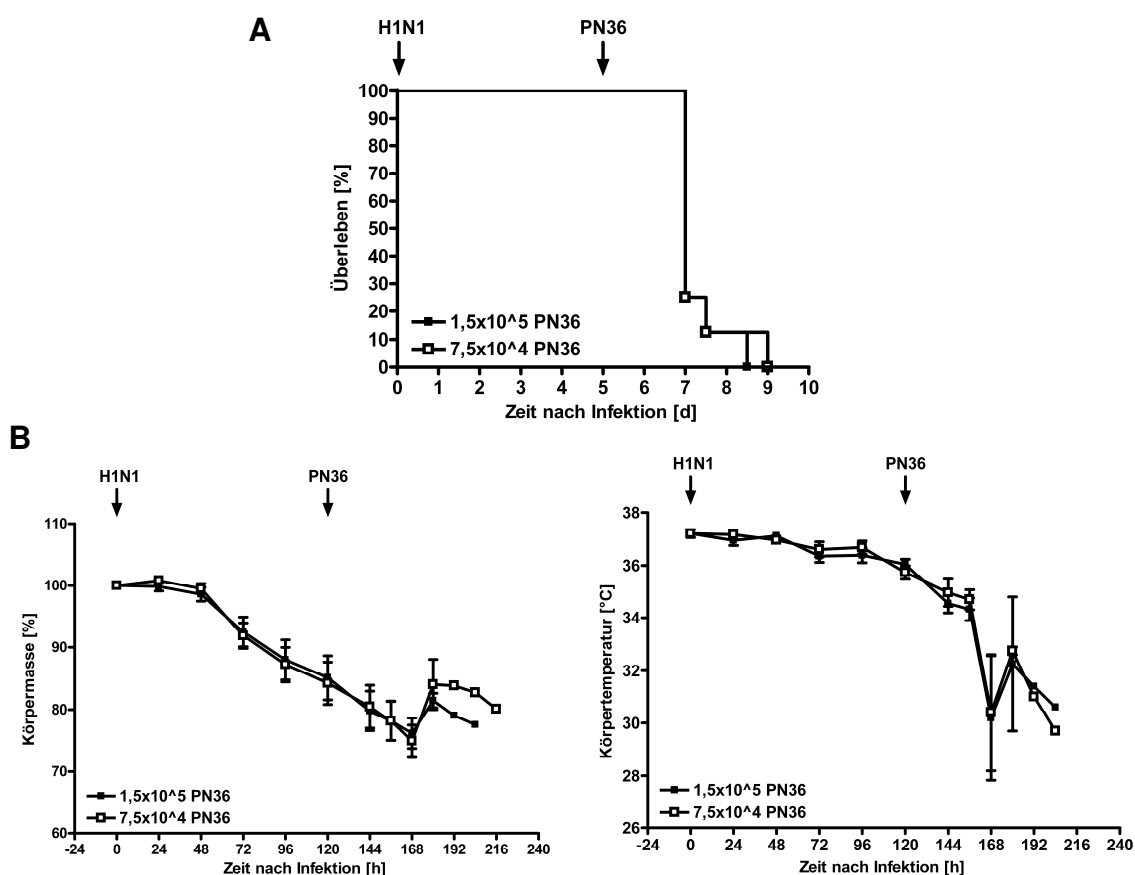


Abb. 45. Bestimmung der optimalen Infektionsdosen für die sekundär bakterielle Infektion. C57BL/6 Mäuse wurden am Tag 0 mit 30 pfu H1N1 infiziert. Am Tag 5 erfolgte die sekundäre Infektion mit *S.pneumoniae* PN36. Dabei wurden Mäuse mit $1,5 \cdot 10^5$ PN36 oder $7,5 \cdot 10^4$ PN36 i.n. infiziert. Die Tiere wurden einmal bzw. nach der Infektion mit *S.pneumoniae* zweimal täglich begutachtet. Dargestellt ist das Überleben der Tiere (**A**) sowie die Mittelwerte der Körpermasse in % und der -temperatur \pm SEM (n = 8) (**B**).

Um die Wirkung der IL-17 – Blockade auf die sekundär bakterielle Infektion zu analysieren sollten als nächstes die Tiere sowohl mit H1N1 als auch *S.pneumoniae* infiziert und aller 3 Tage mit 300 μ g anti-IL-17 behandelt werden (Tag 1, 4 und 7 nach Primärinfektion) (Abb.46). Den Kontrolltieren wurde Maus-IgG analog appliziert. Um das Überleben der Tiere zu erhöhen, wurden diese mit der niedrigen Infektionsdosis 10 pfu H1N1 und am Tag 5 mit $1 \cdot 10^4$ PN36 infiziert. Wie bereits im Vorexperiment beschrieben wurden die Mäuse täglich begutachtet. Am Tag 7 nach Primärinfektion sind noch 70 % der

Tiere am Leben. Dies ist vermutlich auf die sehr niedrigen Infektionsdosen zurückzuführen. Dabei zeigen die anti-IL-17-behandelten Tiere eine 100%ige Überlebensrate bis zum Tag 7 nach Primärinfektion (Abb.46A). Im weiteren Verlauf der Doppelinfektion kommt es jedoch trotz der sehr niedrigen Infektionsdosen zu einer Mortalitätsrate von 100 %, sodass am Tag 9 nach der Primärinfektion alle Tiere verstorben sind. Die IL-17 – Blockade führt daher zu keiner erhöhten Überlebensrate der Tiere im gesamten Verlauf der Doppelinfektion. Nach der Primärinfektion mit H1N1 (10 pfu) verlieren die Tiere weder an Körpermasse noch kommt es zu einer Reduktion der Körpertemperatur (Abb.46B). Erst die Sekundärinfektion führt zu einem ernsthaften Krankheitsverlauf – sichtbar an der Reduktion des Körpergewichts um 20 % bzw. der –temperatur von 37 auf 30°C am Tag 8. Auch hier hat die IL-17 – Blockade keinen Einfluss auf das Körpergewicht und die –temperatur der Tiere. Somit führt die Applikation von anti-IL-17 in diesem Doppelinfektionsmodell nicht zu einem mildereren Krankheitsverlauf.

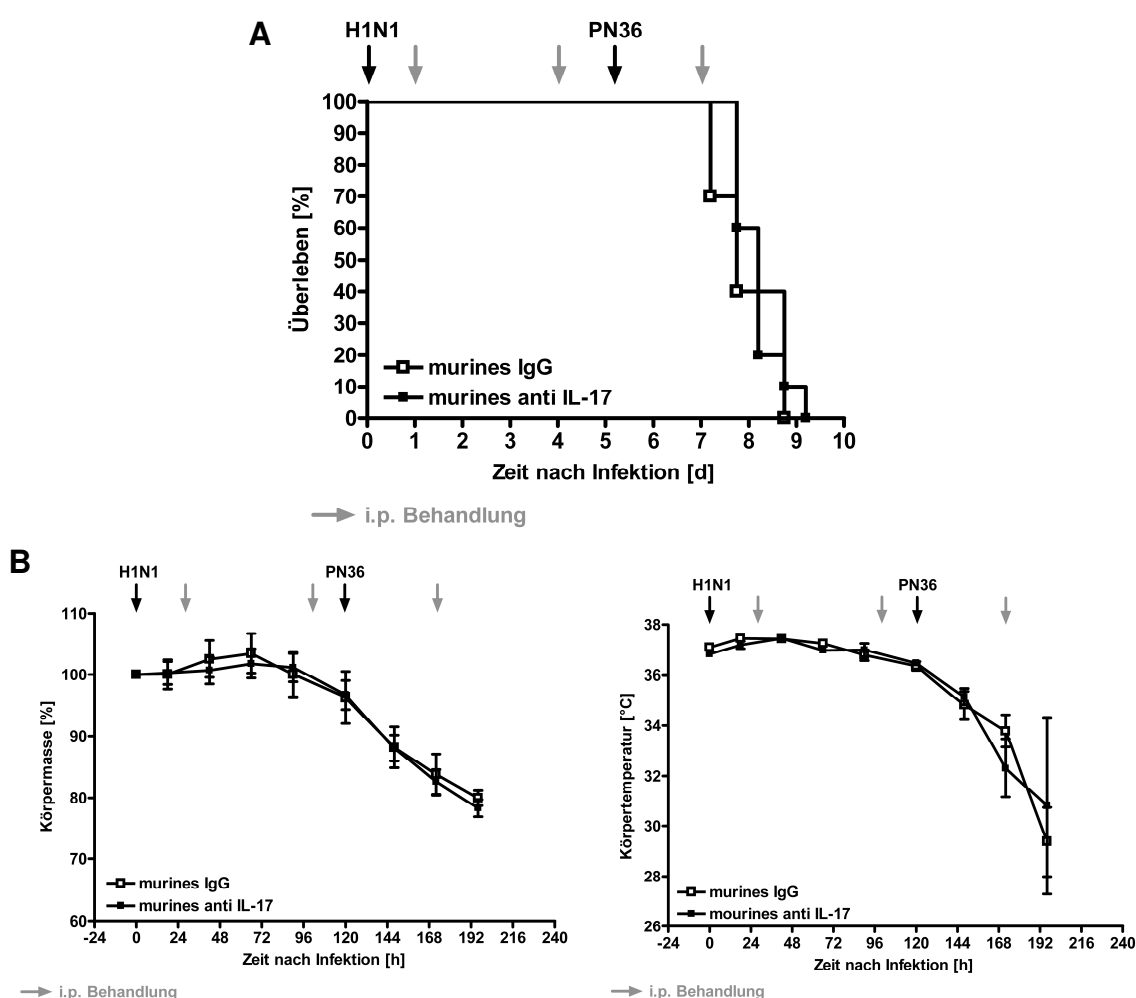


Abb. 46. Einfluss der anti-IL-17-Applikation auf den Krankheitsverlauf einer Doppelinfektion. C57BL/6 Mäuse wurden am Tag 0 mit 10 pfu H1N1 und am Tag 5 mit 1×10^4 PN36 infiziert. Den Mäusen wurde am Tag 1, 4 und 7 300 µg anti-IL-17 (Klon MM17F3) bzw. Maus-IgG (= Kontrolle) i.p. appliziert. Die Tiere wurden einmal bzw. nach der Infektion mit *S.pneumoniae* zweimal täglich untersucht. Dargestellt ist sowohl das Überleben der Tiere (**A**) als auch die Mittelwerte der Körpermasse in % und der –temperatur \pm SEM (n = 10) (**B**). Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

5. DISKUSSION

5.1. Zusammenfassung

Die Einteilung der T_H-Zellen erfolgt über die Expression von Zytokinen und Transkriptionsfaktoren. Obwohl IL-17-produzierende T_H-Zellen schon lange bekannt waren, wurden diese Zellen erst 2005 als „T_H17-Zellen“ bezeichnet. T_H17-Zellen besitzen eine pathogene Funktion in Autoimmunerkrankungen, können aber auch in verschiedenen bakteriellen Infektionen eine protektive Wirkung haben. Daher ist für die Entwicklung neuer Therapieansätze ein Verständnis über deren Plastizität und Stabilität essentiell.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Stabilität und Plastizität von T_H17-Zellen *in vitro* untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass T_H17-Zellen *in vitro* ihren Phänotyp nur unter T_H17-stabilisierenden Bedingungen (TGF- β , IL-6, anti-IFN- γ , anti-IL-4) beibehalten. Werden jedoch T_H17-Zellen nach einer Woche unter alternativen Bedingungen (z.B. T_H1-Bedingungen: IL-12 und anti-IL-4) kultiviert, verändert sich ihr Zytokinprofil. Die Stimulation der T_H17-Zellen mit IL-12 und anti-IL-4 führt zur Expression von IFN- γ , dem charakteristischen T_H1-Zytokin. Die IL-17-Expression wird in diesen Zellen herunterreguliert.

Als nächstes wurde die Stabilität und Plastizität von T_H17-Zellen *ex vivo* analysiert. Dafür wurden die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) – das Mausmodell der Multiplen Sklerose (MS) – und die Glukose-6-phosphat Isomerase- (G6PI-) induzierte Arthritis als charakteristische T-Zell-vermittelte Autoimmunmodelle herangezogen. In beiden Autoimmunmodellen besitzen T_H17-Zellen eine pathogene Funktion. Aus diesen Autoimmunmodellen isolierte T_H17-Zellen produzieren unter definierten Kulturbedingungen *in vitro* weniger IL-17. Im Gegensatz dazu kommt es zu einer Zunahme an IL-17/IFN- γ -Doppelproduzenten sowie IFN- γ -Singleproduzenten. Die Ergebnisse zeigen, dass T_H17-Zellen *ex vivo* plastisch sind und zu T_H1/T_H17- oder T_H1-Zellen konvertieren können.

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurde die Rolle des proinflammatorischen Zytokins IL-17 in einem Influenzavirus Infektionsmodell untersucht. Zellen des angeborenen Immunsystems – insbesondere $\gamma\delta$ T-Zellen - exprimieren IL-17 unmittelbar nach der Infektion und führen zur Rekrutierung inflammatorischer Zellen in das Lungengewebe. Die Blockade von IL-17 mit einem Antikörper (Klon MM17F3) nach der intranasalen Infektion mit dem Influenzavirus A/PR/8/34 (H1N1) resultiert in einem milderem Krankheitsverlauf und in einer reduzierten Viruslast in den Lungen der infizierten Mäuse. Darüber hinaus inhibiert die anti-IL-17-Applikation die Infiltration neutrophiler Granulozyten in das Lungengewebe und führt sowohl zu einer stark reduzierten Immunpathologie als auch zu einer verminderten Anzahl an IFN- γ -produzierenden CD8⁺ T- und NK1.1⁺ Zellen. Auf transkriptioneller Ebene konnte schließlich mithilfe von Genomanalysen gezeigt werden, dass für antivirale Proteine kodierende mRNA in den Lungen der anti-IL-17-behandelten Mäuse im Vergleich zu der Kontrollgruppe verstärkt exprimiert werden. Dies könnte die verringerte Viruslast, die bessere Immunabwehr und demzufolge auch die geringere Mortalität der Tiere erklären. Zusätzlich wurde die H1N1-Infektion in IL-17 ko Tieren untersucht. Im Vergleich zur anti-IL-17-Applikation hat die Infektion in diesen Tieren einen ähnlichen Krankheitsverlauf wie in den Kontrolltieren. Da unter physiologischen Bedingungen eine erhöhte Mortalität meist durch eine sekundäre bakterielle Infektion ausgelöst wird, erfolgte die IL-17 – Blockade auch nach einer Koinfektion mit H1N1 und *Streptococcus pneumoniae*. Auch in einer sekundären bakteriellen Infektion führte die anti-IL-17-Applikation zu keiner erhöhten Überlebensrate der Tiere.

5.2. Stabilität und Plastizität von T_H17-Zellen

Das immunologische Gedächtnis besitzt eine Schlüsselfunktion im adaptiven Immunsystem. T- und B-Zellen werden spezifisch aktiviert und sind nach erneutem Kontakt mit dem Antigen in der Lage wesentlich schneller und effektiver zu reagieren als naive Lymphozyten. Dabei ist die Expression spezifischer Effektormoleküle, insbesondere Zytokine, die den Typ und das Ausmaß einer Immunreaktion bestimmen, abgespeichert. Die molekulare Grundlage des Zytokingedächtnisses von T_H-Zellen beinhaltet die Expression von Transkriptionsfaktoren sowie die epigenetischen Modifikationen der Zytokingene und Genloci [17, 18, 204].

Das Zytokingedächtnis von *Il-4* und *Ifn-γ* basiert auf einer epigenetischen Modifikation der Zytokingene sowie der Transkriptionsfaktoren GATA-3 und T-bet, entsprechend für die T_H2- und T_H1-Differenzierung [205]. Diese epigenetischen Veränderungen werden u.a. über kovalente Histonveränderungen vermittelt. Mehrere Publikationen konnten belegen, dass in T-Zellen die Gentranskription über Histonmodifikationen reguliert werden [206, 207]. Der T_H2- (*Il-4/Il-5/Il-13/Rad50*) und T_H1-Genlocus (*Ifn-γ*) in den Genpromotoren und konservierten nicht-kodierenden Sequenzen unterliegt extremen Chromatinveränderungen, wenn naive T-Zellen in T_H1- oder T_H2-Zellen differenzieren [208]. 2007 konnte von Akimzhanov *et al.* gezeigt werden, dass auch im *Il-17-Il-17F* Genlocus der T_H17-Zellen Chromatinveränderungen vorkommen [209]. Dabei wird die Histonveränderung in der frühen Phase der T_H-Aktivierung durch die Kombination von TGF-β und IL-6 begünstigt. Darüber hinaus ist die Re-expression von IL-17 von den T_H17-spezifischen Transkriptionsfaktoren RORγt und RORα abhängig [63]. Nach der Beschreibung der T_H17-Zellen gab es keine Belege darüber, ob die Chromatinmodifizierung im *Il-17-Il-17F* Genlocus und der Transkriptionsfaktor ROR ausschlaggebend für die Re-expression von IL-17 sind. Ferner gab es keine Beweise für die Reprogrammierung von T_H17-Zellen durch den TZR sowie durch die Zytokine IL-12 oder IL-4. *In vitro* inhibieren IL-4 und IFN-γ die Induktion der T_H17-Differenzierung [11]. *In vivo* hingegen sind T_H-Zellen existent, die IL-17 und IFN-γ koexpressieren können. Demzufolge schließt sich *in vivo* die Induktion von IL-17 und IFN-γ gegenseitig nicht aus [9, 21, 210, 211]. Vermutlich existiert ein komplexer Zusammenhang zwischen T_H1- und T_H17-Zellen.

Durch die Funktion der T-Zellsubpopulationen in verschiedenen Autoimmunerkrankungen ist das Verständnis über deren Stabilität für die Entwicklung neuer Therapieansätze essentiell. Aufgrund der Beschreibung von IFN-γ⁺/IL-17⁺ CD4⁺ T-Zellen *in vivo* stellt sich nun die Frage, ob T_H17-Zellen eine distinkte Zelllinie repräsentieren, und wenn ja, wie plastisch diese Zellen unter alternativen Kulturbedingungen sind.

Aus diesem Grund steht im ersten Teil dieser Arbeit die Stabilität und Plastizität der T_H17-Zellen *in vitro* und *ex vivo* im Mittelpunkt. Für die Analyse von T_H17-Zellen wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Zellbiologie des Deutschen Rheumaforschungszentrums (Prof. Andreas Radbruch) und Miltenyi Biotec GmbH ein IL-17 *Cytokine Secretion Assay* entwickelt, um vitale T_H17-Zellen zu isolieren.

5.2.1. Die Plastizität von *in vitro* generierten T_H17-Zellen

In vitro Experimente belegen, dass T_H1- und T_H2-Zellen ihren Phänotyp auch unter adversen polarisierenden Bedingungen beibehalten [17]. Dies ist jedoch erst nach einer definierten Anzahl an Zellteilungen zu beobachten. Für die Stabilität der T-Zellen ist demzufolge ein transkriptionelles Programm relevant [18, 19]. Dabei spielen die sogenannten Master-Transkriptionsfaktoren T-bet und

GATA-3 für T_H1- bzw. T_H2-Zellen eine entscheidende Rolle. T-bet induziert in T_H-Zellen die Expression der β 2-Kette des IL-12-Rezeptors und ermöglicht so eine Reaktion der Zellen auf IL-12 und eine Entwicklung der Zellen in Richtung T_H1-Zellen [212-214]. IL-4 verhindert die IL-12R β 2-Expression und wirkt der T_H1-Differenzierung entgegen [215]. Die Koexpression von IL-4 und IFN- γ konnte bereits 1999 von Löhning *et al.* gezeigt werden [216]. Auch auf transkriptioneller Ebene konnten GATA-3⁺T-bet⁺ T_H-Zellen *in vivo* nachgewiesen werden [217]. T_H2-Zellen können nach wiederholter Stimulation mit Typ I bzw. Typ II IFN und IL-12 neben IL-4 auch IFN- γ produzieren. Diese Zellen sind *in vivo* für einige Monate stabil [217].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass *in vitro* generierte T_H1-Zellen nicht zu T_H17-Zellen konvertieren können. Auch *in vitro* generierte T_H2-Zellen lassen sich nicht zu T_H17-Zellen umwandeln [190]. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass in T_H1-Zellen, die unter T_H17-Bedingungen kultiviert wurden, ROR γ t und ROR α hochreguliert werden. Vermutlich sind die beiden T_H17-spezifischen Transkriptionsfaktoren für die IL-17-Expression in T_H1-Zellen nicht ausreichend. Neben der Zunahme an ROR γ t und ROR α steigt auch die Expression von T-bet in den Zellen. T-bet wurde als negativer Regulator der T_H17-Differenzierung beschrieben [218, 219]. Eventuell würde eine höhere Expression von ROR γ t und ROR α den Effekt von T-bet kompensieren. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass sich IFN- γ /IL-17-Doppelproduzenten *in vivo* nicht aus T_H1-Zellen entwickeln. Im Gegensatz dazu konnte allerdings von Kurschus *et al.* gezeigt werden, dass T_H1-Zellen auch IL-17 exprimieren können [220]. Diese IL-17-produzierenden T_H1-Zellen wurden in den mesenterialen Lymphknoten nach Transfer von T_H1-Zellen in RAG-defiziente Mäuse nachgewiesen.

Welche Wirkung haben jedoch definierte Kulturbedingungen auf die Stabilität und Plastizität von T_H17-Zellen? *In vitro* generierte T_H17-Zellen sind in der Lage durch die Restimulation des TZR und IL-12 sowie anti-IL-4 in T_H1-Zellen zu konvertieren. Dies äußert sich in der verstärkten Produktion an IFN- γ . Im Gegensatz dazu ist keine IL-17-Produktion mehr nachweisbar. Lediglich nach erneuter Stimulation mit TGF- β und IL-6 (T_H17-Bedingungen) bleibt die IL-17-Produktion in den CD4⁺ T-Zellen erhalten. Dabei wurde jedoch in dieser Arbeit vernachlässigt, dass die *in vitro* differenzierten T_H17-Zellen keine 100 %ige Frequenz an IL-17 aufweisen. Die Zellfraktion beinhaltet eine Vielzahl an CD4⁺ T-Zellen, die nicht IL-17 produzieren. Durch die Entwicklung des murinen IL-17 *Cytokine Secretion Assays* war es schließlich möglich vitale IL-17⁺ Zellen zu sortieren. Somit konnten wir zeigen, dass *in vitro* generierte und sortierte T_H17-Zellen in T_H1- oder T_H2-Zellen konvertieren können [190]. Dabei werden auf mRNA-Ebene nicht nur die Transkriptionsfaktoren ROR γ t und ROR α herunterreguliert, sondern auch der IL-23-Rezeptor (IL-23R) und die T_H17-spezifischen Zytokine IL-17F, IL-22 und IL-21. Im Gegensatz dazu werden in den T_H17-Zellen unter T_H1-Bedingungen auf Proteinebene IFN- γ sowie auf mRNA-Ebene T-bet hochreguliert. T_H2-Bedingungen führen *in vitro* zur Expression von IL-4 und GATA-3 in den T_H17-Zellen.

In vitro Analysen zeigen, dass die Plastizität von T_H1- und T_H2-Zellen von wiederholten Restimulationsrunden abhängig ist [17]. Aus diesem Grund wurden von Lexberg *et al.* auch T_H17-Zellen analysiert, die bereits 18 Tage unter T_H17-Bedingungen kultiviert wurden [190]. Auch T_H17-Zellen nach drei Wochen *in vitro* Kultur konvertieren unter den entsprechenden Bedingungen in T_H1-Zellen bzw. in T_H2-Zellen. Nur die wiederholte *in vitro* Stimulation von T_H17-Zellen mit TGF- β , IL-6 und IL-23 führt zu einer stabilen IL-17-Expression.

Diese Ergebnisse belegen, dass *in vitro* generierte T_H17-Zellen keinen stabilen Phänotyp besitzen.

5.2.2. Plastizität von T_H17-Zellen isoliert aus Autoimmunmodellen

Von wesentlich größerer Bedeutung ist die Plastizität der inflammatorischen T_H17-Zellen *in vivo*. In verschiedenen Tiermodellen konnte bereits gezeigt werden, dass Antigen-spezifische T_H17-Zellen für die Pathogenese Organ-spezifischer Autoimmunerkrankungen relevant sind, so z.B. in Tiermodellen der Rheumatoiden Arthritis [161] und im Mausmodell der Multiplen Sklerose, der EAE [221, 222]. In der Glukose-6-phosphat Isomerase-induzierten Arthritis konnte von Schubert *et al.* bewiesen werden, dass CD4⁺ T-Zellen wichtige IL-17-Produzenten sind [192]. In diesem Modell wird durch die Immunisierung mit heterologer Glucose-6-phosphat Isomerase (G6PI) in verschiedenen nicht-transgenen Inzuchtstämmen eine symmetrische Polyarthritits in den distalen Gelenken induziert. Am Tag 9 nach Immunisierung entwickeln die Mäuse die ersten klinischen Symptome, die um den Tag 15 am stärksten ausgeprägt sind. Danach klingen die Symptome langsam wieder ab. In der G6PI-induzierten Arthritis sind CD4⁺ T-Zellen sowohl in der Induktionsphase als auch in der Effektorphase pathogenetisch relevant: Während die CD4⁺ T-Zellen proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-17 und IL-6 produzieren, werden wenig bzw. kein IFN- γ , IL-2, IL-4 und IL-10 nach Antigen-spezifischer Restimulation mit G6PI produziert. Aufgrund der Arbeit mit dem G6PI-Modell in der Arbeitsgruppe von Prof. Kamradt wurde bereits die Antigen-spezifische Expression der CD4⁺ T-Zellen in den sekundär lymphatischen Organen im Verlauf der G6PI-induzierten Arthritis analysiert. Die Antigen-spezifischen Zellen wurden über die Expression von CD154, dem CD40 Liganden, identifiziert. Die Aktivierung von T_H-Zellen über ihren TZR führt zur schnellen Hochregulation von CD154 auf der Zelloberfläche. In unterschiedlichen Publikationen konnte gezeigt werden, dass CD154 ein sensibler und vor allem spezifischer Marker für Antigen-spezifische T_H-Zellen ist [186, 223-226]. Die höchste Frequenz an IL-17⁺CD154⁺CD4⁺ T-Zellen in der Milz als auch in den drainierenden Lymphknoten wurde am Tag 9 nach Immunisierung beobachtet [193].

Aufgrund dieser Vorkenntnisse sollten für die Analyse die T_H17-Zellen aus den Milzen der G6PI-immunisierten Tiere am Tag 9 sortiert werden und *in vitro* auf Stabilität bzw. Plastizität untersucht werden. Aufgrund der geringen Anzahl an Antigen-spezifischen T_H17-Zellen wurden die Zellen für die Isolation polyklonal restimuliert. Ähnlich wie T_H17-Zellen *in vitro*, re-produzieren T_H17-Zellen *ex vivo* IL-17 nur nach erneuter Stimulation mit TGF- β und IL-6. Unter veränderten polarisierenden Bedingungen re-exprimieren die Zellen kein bzw. wenig IL-17. Werden T_H17-Zellen *in vitro* mit IL-12 und anti-IL-4 kultiviert produzieren 50 % der Zellen IFN- γ und konvertieren somit zu T_H1-Zellen.

Auch die Stimulation mit IL-23 führt nicht zu einer Aufrechterhaltung der IL-17-Expression in den T_H17-Zellen *ex vivo* G6PI-immunisierter Mäuse, obwohl IL-23 die T_H17-Antwort fördert und das inflammatorische Potential dieser Zellen erhöht [25]. Lediglich 20 % der Zellen re-produzieren IL-17 nach 6 Tagen *in vitro*, während eine Zunahme der IFN- γ -produzierenden CD4⁺ T-Zellen zu verzeichnen ist. Eventuell wird der IL-23R auf den T_H17-Zellen *ex vivo* nicht bzw. nur gering exprimiert, obwohl gezeigt wurde, dass dieser Rezeptor auf sich differenzierenden T_H17-Zellen hochreguliert wird.

Während in T_H17-Zellen die IL-23R-Kette verstärkt exprimiert wird, erfolgt die Expression der IL-12R β 2-Kette in sich entwickelten T_H1-Zellen. Die Kombination der IL-23R-Kette bzw. IL-12R β 2-Kette mit der IL-12R β 1-Kette entscheidet, ob die Zelle auf IL-23 bzw. IL12 reagieren kann und beeinflusst somit die Entwicklung in die entsprechende Zelllinie. Für die terminale Differenzierung von T_H17-Zellen *in vivo* ist der IL-23R essentiell [227]. Im Jahr 2009 konnte allerdings von Lee *et al.* gezeigt werden, dass *in vitro* generierte T_H17-Zellen durch Stimulation mit IL-23, jedoch ohne TGF- β , IFN- γ anstelle von IL-17

exprimieren [228]. Somit besitzt TGF- β *in vitro* die relevante Funktion die IL-17-Expression in T_H17-Zellen aufrecht zu erhalten.

Aufgrund der ersten Daten aus dem G6PI-Arthritismodell stellt sich die Frage, ob der Typ der Autoimmunerkrankung einen Einfluss auf die Stabilität von T_H17-Zellen hat. Um diese Frage zu beantworten, wurden T_H17-Zellen zusätzlich aus EAE-erkrankten Mäusen sortiert und deren Plastizität *in vitro* analysiert - analog den T_H17-Zellen *ex vivo* G6PI-immunisierter Mäuse. Die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist ein Mausmodell für die Multiple Sklerose (MS) im Speziellen und ein Modell für T-Zell-vermittelte Autoimmunität im Allgemeinen. Aufgrund der Funktion von T_H17-Zellen in der Pathogenese der EAE ist dieses Mausmodell somit ein geeignetes Modell für die Analyse der Stabilität der T_H17-Zellen. Induziert wird die EAE durch die Immunisierung mit Myelin-Antigenen. Das klassische Modell der EAE wird durch die Immunisierung von C57BL/6 Mäusen mit einem Myelin-Oligodendrozyten Glykoprotein Peptid (MOG₃₅₋₅₅) hervorgerufen.

Dabei sollte auch eine weitere Frage beantwortet werden: Hat der Zeitpunkt der Isolation und damit auch das umgebende Milieu, aus denen die T_H17-Zellen gewonnen werden, einen Einfluss auf die Stabilität dieser Zellen?

Für die Isolation der gewünschten Zellpopulation aus MOG₃₅₋₅₅-immunisierten Mäusen wurden zwei verschiedene Zeitpunkte gewählt. Zum einen wurden die Zellen aus der Induktionsphase aus den Milzen und zum anderen aus der Effektorphase aus dem Zielorgan, dem ZNS, isoliert. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl T_H17-Zellen aus der Induktionsphase, als auch aus der Effektorphase *in vitro* nicht stabil sind. Unabhängig von den definierten Kulturbedingungen konvertieren die T_H17-Zellen in T_H1/T_H17- bzw. T_H1-Zellen. Die Analyse der T_H17-Zellen isoliert aus der Effektorphase zeigt, dass nach 6 Tagen *in vitro* über die Hälfte der IL-17-Produzenten zusätzlich IFN- γ produzieren. Ein geringer Teil der Zellen ist vollständig zu IFN- γ -Produzenten konvertiert. Im Gegensatz dazu konvertieren mehr T_H17-Zellen, isoliert am Tag 14 nach Immunisierung aus dem ZNS, in T_H1-Zellen. Allerdings zeigt ein großer Teil der Zellen weder eine IL-17- noch eine IFN- γ -Expression. Vergleicht man die Zytokinexpression der CD4⁺ T-Zellen am Tag 7 und 14 nach Immunisierung ist zu sehen, dass im ZNS im Vergleich zur Milz der Anteil an IFN- γ /IL-17-Doppelproduzenten deutlich größer ist. Der Nachteil an diesem System ist, dass diese Doppelproduzenten mithilfe des IL-17 CSA neben den IL-17-Singleproduzenten auch als IL-17-positive Fraktion sortiert werden.

Die Daten lassen vermuten, dass sich die IL-17-Produzenten über die Stufe der Doppelproduzenten (IFN- γ ⁺/IL-17⁺) schließlich zu IFN- γ ⁺ T-Zellen konvertieren. In den T_H17-Zellen unmittelbar nach dem Sortieren ist bereits auf mRNA-Ebene neben ROR γ t und ROR α auch T-bet nachweisbar. Eventuell besitzen die sogenannten „*in vivo* differenzierten“ T_H17-Zellen bereits die transkriptionelle Information für T_H1-Zellen und können unter entsprechenden Bedingungen auch IFN- γ exprimieren. Mithilfe eines IL-17/IFN- γ Doppel-Cytokine Secretion Assays wurden IFN- γ ⁺/IL-17⁻, IFN- γ ⁻/IL-17⁺ oder IFN- γ ⁺/IL-17⁺ CD4⁺ T-Zellen *ex vivo* am Tag 7 nach Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅ isoliert [229]. Dabei konnte gezeigt werden, dass IFN- γ ⁺/IL-17⁺ CD4⁺ T-Zellen eine hohe Expression von ROR γ t aber auch – in einem wesentlich geringerem Ausmaß – von T-bet aufweisen. Im Gegensatz dazu ist nach 6 Tagen *in vitro*-Kultur unter T_H2-polarisierenden Bedingungen weder IL-4 noch GATA-3 mRNA in den T_H17-Zellen zu detektieren. Unmittelbar nach dem Sortieren konnte in den T_H17-Zellen auch keine GATA-3 mRNA nachgewiesen werden, sodass eventuell die Zellen keine transkriptionelle Information für T_H2-Zellen besitzen.

Im Gegensatz zu T_H17-Zellen aus Mäusen mit Autoimmunerkrankungen, zeigen T_H17-Gedächtniszellen aus älteren naiven Mäusen eine größere Stabilität [190]. Diese T_H17-Gedächtniszellen re-exprimieren IL-17 nach Stimulation mit IL-23, IL-12 und anti-IL-4 oder IL-4, anti-IFN- γ und anti-IL-12. Auf mRNA-Ebene werden die Transkriptionsfaktoren T-bet und GATA-3 unter T_H1- bzw. T_H2-Bedingungen in den T_H17-Zellen im Vergleich zu *in vitro* differenzierten T_H17-Zellen nur gering exprimiert. T_H17-Zellen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Krankheitsverlauf isoliert wurden, hingegen sind plastisch und besitzen die Fähigkeit zu konvertieren. Aufgrund des hohen inflammatorischen Potentials der T_H17-Zellen in Autoimmunerkrankungen scheint dieser Mechanismus notwendig zu sein, um den Organismus vor sich selbst zu schützen. Eventuell benötigen T_H17-Zellen *in vivo* wiederholte Stimulationen, um einen stabilen Phänotyp zu entwickeln. Darüber hinaus sind die Autoimmunmodelle durch die Immunisierung mit Komplettem Freund'schen Adjuvanz ein artifizielles System als z.B. Infektionen.

Verschiedene Publikationen konnten zeigen, dass in *in vivo* aktivierten T_H17-Zellen die IL-17-Produktion sehr schnell gestoppt werden kann und eine Umwandlung der Zellen in T_H1-Zellen stattfindet [220, 230, 231]. Bending *et al.* konnten die Konvertierung von T_H17-Zellen in T_H1-Zellen zeigen [231]. Dabei wurden T_H17-Zellen aus BDC2.5NOD Mäusen *in vitro* generiert, die Zellen über eine Tetramerfärbung sortiert und in NOD/SCID-Rezipienten transferiert. Vergleichbar zum Transfer von T_H1-Zellen wird durch den Transfer von T_H17-Zellen in Mäusen Diabetes, allerdings mit einer zeitlichen Verzögerung, ausgelöst. Um T_H17-Zellen *in vivo* zu analysieren gibt es neben dem IL-17 CSA noch weitere Möglichkeiten – so z.B. der Einsatz von IL-17-Reportermäusen, in denen die Expression von IL-17 an ein Fluoreszenzprotein gekoppelt ist. Nurieva *et al.* generierten T_H17-Zellen aus IL-17F-Reportermäusen, transferierten diese in WT oder RAG-1-defiziente Mäuse und immunisierten die Tiere mit dem Ovalbumin-Peptid [232]. Dabei konnte gezeigt werden, dass T_H17-Zellen nach Transfer in WT Tiere jedoch nicht in RAG-1-defiziente Mäuse stabil bleiben und IL-17 re-exprimieren. Auch in einem Transfermodell der Colitis konvertieren *in vitro* generierte T_H17-Zellen zu T_H1-Zellen [228].

Hirota *et al.* analysierten die Plastizität von T_H17-Zellen unter verschiedenen inflammatorischen Entzündungen mithilfe von IL-17A-Reportermäusen (IL17a^{Cre}R26R^{eYFP}) [230]. Chronische Entzündungen wie EAE induzieren in den T_H17-Zellen einen Wechsel zu alternativen Zytokinen, während in akuten Infektionen, hervorgerufen z.B. durch *Candida albicans*, kein Zytokinwechsel zu beobachten ist. Die IL-17-Expression der T_H17-Zellen wird jedoch herunterreguliert. Die bereits aufgestellte Hypothese, dass sich T_H1/T_H17- bzw. T_H1-Zellen aus T_H17-Zellen entwickeln können, wird durch diese Publikation zusätzlich bestätigt. Somit wurde nachgewiesen, dass IFN- γ und weitere proinflammatorische Zytokine wie GM-CSF, TNF und IL-22 von den sogenannten ex-T_H17-Zellen im EAE-Mausmodell produziert werden.

Kurschus *et al.* untersuchten die Plastizität von T_H17-Zellen mithilfe von IL-17F-Reportermäusen (2D2 x IL-17F-Cre^{eYFP}), ebenfalls im EAE-Mausmodell [220]. Es wurde gezeigt, dass 95 % der EGFP⁺ Zellen aus diesen Reportermäusen IL-17A und/oder IL-17F exprimieren und somit T_H17-Zellen repräsentieren [233]. Allerdings wurde herausgefunden, dass IL-17F in neuronalen Entzündungen nur gering exprimiert wird, entsprechend der Feststellung, dass eine IL-17F-Defizienz nicht vor der Induktion einer EAE schützt [234]. Dennoch wurden *in vivo* generierte T_H17-Zellen (CD4⁺EGFP⁺) aus MOG₃₅₋₅₅-immunisierten IL-17F-Reportermäusen in RAG-defiziente Mäuse transferiert, um deren Plastizität zu untersuchen. Die Ergebnisse belegen, dass die früh differenzierten Zellen in den sekundär lymphatischen Organen wie

Milz und Lymphknoten IL-17A bzw. IL-17A und IFN- γ exprimieren, während im ZNS vorwiegend IFN- γ + CD4⁺ T-Zellen zu finden sind.

Die genannten Publikationen beschreiben somit, dass T_H17-Zellen zu T_H1-Zellen konvertieren können. Diese Resultate zeigen zusätzlich, dass das Umfeld der Zellen eine große Auswirkung auf die Dynamik des Phänotyps hat. So besitzen T_H17-Zellen, die mit TGF- β und IL-6 differenziert wurden nur ein geringes pathogenes Potential. Diese Zellen produzieren neben IL-17 auch IL-10, welches die inflammatorische Immunantwort einschränkt. In Anwesenheit von IL-23 konvertieren diese T_H17-Zellen zu pathogenen T_H17-Zellen, die schließlich proinflammatorische Zytokine anstelle von IL-10 exprimieren [235]. Auch Hirota *et al.* konnten zeigen, dass IL-23 eine wichtige Funktion bei der Konvertierung von T_H17-Zellen zu T_H1/T_H17-Zellen besitzt. IL-23 induziert die Induktion von T-bet und führt somit zur Produktion von IFN- γ in ex-T_H17-Zellen. Dies ist ein wichtiger Schritt in der Pathophysiologie der EAE, da IFN- γ den größten Anteil der Zytokine im Rückenmark von EAE-erkrankten Mäusen ausmacht.

Auch die IL-12R β 2-Kette hat einen Einfluss auf die Plastizität von T_H17-Zellen [229]. Während die IL-12R β 2-Kette auf T_H17-Zellen *in vitro* exprimiert wird, ist diese auf T_H17-Zellen *in vivo* nicht vorhanden. *Ex vivo* isolierte T_H17-Zellen können durch die kombinierte Stimulation der Zellen mit IFN- γ und IL-12 zu T_H1/T_H17-Zellen konvertiert werden. Dabei ist IFN- γ für die Expression von T-bet sowie für die Hochregulation der IL-12R β 2-Kette notwendig [212-214].

Neben dem Umfeld der T_H17-Zellen wird die Plastizität dieser Zellen auch über epigenetische Histonmodifikationen erklärt [236]. Dabei wurden *in vitro* generierte T_H17-Zellen untersucht. In diesen Zellen sind die Genloci *Tbx21* und *Gata-3* durch einen bivalenten epigenetischen Status charakterisiert. Diese Resultate bedeuten, dass T_H17-Zellen somit prädispositioniert sind in T_H1- oder T_H2-Zellen zu konvertieren. Diese Reprogrammierung ist mit großer Wahrscheinlichkeit unidirektional, da repressive epigenetische Konfiguration in den Genloci *Il-17A* und *Rorc* in T_H1- und T_H2-Zellen nachgewiesen wurden. Diese Ergebnisse beweisen, dass T_H17-Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* formbar sind und bereits auf Molekularebene die Information für die Konvertierbarkeit besitzen. Somit ist das Dogma der T-Zellsubpopulationen *in vivo* nicht gegeben. Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse belegen, dass die T_H17-Antwort transient ist und sehr schnell „abgeschaltet“ werden kann. In Bezug auf die Funktion dieser proinflammatorischen Zellpopulation ist diese Konvertierbarkeit von Nutzen, um z.B. den Organismus vor einer überschießenden Immunreaktion zu schützen. Nach der Aktivierung von T_H17-Zellen kommt es zur Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und schließlich zur Beseitigung von Mikroorganismen. Neutrophile können jedoch auch massive Gewebeschäden verursachen. In der bakteriellen Infektion mit *Listeria monocytogenes* konnte gezeigt werden, dass T_H17-Zellen eher kurzlebig sind im Gegensatz zu langlebigen und stabilen T_H1-Zellen [237]. Eine adäquate und zeitlich begrenzte T_H17-Antwort ist somit notwendig um die Schädigung des Wirtsgewebes zu limitieren.

5.3. Die Rolle des proinflammatorischen Zytokins IL-17 in einem Influenzavirus Infektionsmodell

Influenzaviren sind eine häufige Ursache für humane respiratorische Infektionen. Influenza selbst ist eine akute respiratorische Erkrankung, charakterisiert durch hohes Fieber, Rhinitis, Husten, Kopfschmerzen, Erschöpfung, Unwohlsein sowie eine Inflammation der oberen Luftwege. Neben den jährlich saisonal auftretenden Influenzaviruserkrankungen kommt es alle 8 bis 41 Jahre zu Pandemien.

Influenzaviren gehören zur Familie der *Orthomyxoviridae*. Das virale Genom kodiert für 11 Proteine und besteht aus 8 Segmenten negativer einzelsträngiger RNA [238]. Jedes subgenomische Segment bindet über das virale Nukleoprotein (NP) an die RNA-abhängige RNA-Polymerase. Die Infektion beginnt mit der Bindung des viralen Hämagglutininproteins (HA) an sialinsäurehaltige Glykoprotein- oder Glykolipidrezeptoren auf der Wirtszelloberfläche [239]. Die viralen Partikel werden endozytisch aufgenommen und wandern durch frühe und späte Endosomen. Durch den sauren pH-Wert in den späten Endosomen kommt es zur Konformationsänderung des HA und schließlich zur Fusion der Wirtsmembran mit der viralen Membran. Die Ribonukleoproteine gelangen so in das Zytosol und in den Nukleus [240]. Im Kern erfolgt die Transkription der viralen mRNA [241], aus der wiederum die *positive sense* komplementäre RNA (cRNA) hervorgeht und das neue virale Genom (vmRNA) bildet. Durch die Bindung des NP an die virale RNA erfolgt der Export durch den nukleären Exportkomplex mithilfe der viralen Faktoren M1 und NEP (*nuclear export protein*) /NS2 sowie der Wirtszell-Exportmaschinerie. Die viralen Hüllproteine HA, M2 und Neuraminidase (NA) werden am rauen Endoplasmatischen Retikulum translatiert und an die Zelloberfläche transportiert. Dort erfolgt die Verpackung der löslichen Faktoren M1, RNA-Polymerase und 8 verschiedenen viralen Ribonukleoproteine und schließlich das Ausschleußen (= *budding*) der Virionen. Die Einteilung der Influenza A Viren erfolgt über die 14 verschiedenen HA- und 9 verschiedenen NA-Typen.

Die initiale Influenzavirus Infektion etabliert sich zunächst in den Epithelzellen des Respirationstraktes. Die Viren binden an definierte Rezeptoren der Epithelzellen, Alveolarmakrophagen und DCs, dringen in die Zellen ein und aktivieren Toll-like Rezeptoren (TLRs). Daraufhin wird eine Kaskade von Signalen initiiert, die zunächst zur Produktion von Zytokinen und Chemokinen führt. Diese Signale sind entscheidend für die Rekrutierung der zirkulierenden Leukozyten in den Respirationstrakt. Schließlich wird durch den Prozess der DC-Reifung das adaptive Immunsystem aktiviert.

Die antivirale Wirtsantwort wird vorwiegend durch Interferone vermittelt [242]. Es konnte gezeigt werden, dass plasmazytoide DCs IFN- α und IFN- β produzieren [243], aber auch Alveolarmakrophagen durch eine starke IFN- α -Produktion charakterisiert sind [244].

5.3.1. IL-17-Expression in den Lungen H1N1-infizierter Mäuse

In der vorliegenden Arbeit konnte zunächst gezeigt werden, dass es während einer Influenzavirus Infektion zu einem massiven Anstieg der Leukozyten – insbesondere der Neutrophilen - in der Lunge kommt. Wie bereits 1980 von Sweet *et al.* beschrieben, werden neutrophile Granulozyten nach einer Influenzavirus Infektion in den Respirationstrakt rekrutiert - sowohl im humanen als auch im murinen System [245]. Während die Anzahl der Neutrophilen, als Zellen des angeborenen Immunsystems, ihr Maximum bereits am Tag 3 nach Infektion erreichen, kommt es zu einer Zunahme der CD4⁺, CD8⁺, $\gamma\delta$ und NK1.1⁺ T-Zellen als auch NK Zellen bis Tag 7 nach Infektion. Ferner wurden die identifizierten Zelltypen der Lunge auf deren Zytokinexpression analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass nach Influenzavirus Infektion IL-17 in der Lunge exprimiert wird. $\gamma\delta$ T-Zellen konnten als IL-17-Produzenten innerhalb der ersten 24 h nach Infektion identifiziert werden. Auch $\gamma\delta$ T-Zellen aus naiven Mäusen sind in der Lage nach PMA/Ionomycin-Restimulation IL-17 zu exprimieren. Diese Beobachtung wurde bereits 2005 von Stark *et al.* beschrieben [246]: In naiven C57BL/6 WT Mäusen produzieren 63 % der $\gamma\delta$ T-Zellen aus der Milz IL-17 nach PMA/Ionomycin-Restimulation. Darüber hinaus führt auch die Stimulation

mit anti-CD3 und LPS [247] bzw. IL-23 [139, 248] zur Expression von IL-17 in $\gamma\delta$ T-Zellen. Vermutlich sind $\gamma\delta$ T-Zellen in der Peripherie bereits differenziert, um so schnell wie möglich auf Pathogene reagieren zu können. Dafür spricht der Phänotyp der $\gamma\delta$ T-Zellen. Dieser Phänotyp ist charakterisiert über eine erhöhte Expression von CD44 und einer reduzierten Expression von CD45RB und CD62L, der vielmehr dem Phänotyp von $\alpha\beta$ Gedächtniszellen entspricht [139, 248].

Nach Kalkulation der absoluten Zellzahl ist erkennbar, dass in den Lungen der H1N1-infizierten Tiere die Anzahl der IL-17-produzierenden $\gamma\delta$ T-Zellen geringer ist als die der IL-17-produzierenden konventionellen T-Zellen. Der Grund dafür liegt in der Verteilung der $\gamma\delta$ T-Zellen: innerhalb der Lymphozyten im zirkulierenden Blut und den peripheren Organen ausgewachsener Tiere sind $\gamma\delta$ T-Zellen mit einem Anteil von lediglich 1 bis 5 % vertreten. Dagegen ist diese Lymphozytenpopulation mit einer hohen Frequenz von ca. 50 % in den Epithelien des Verdauungs- und Reproduktionstraktes sowie in der Haut vorhanden [249]. Bereits publizierte Studien zeigen, dass IL-17-produzierende $\gamma\delta$ T-Zellen der angeborenen Immunabwehr eine wichtige Funktion in Autoimmun- und in Infektionserkrankungen einnehmen [151, 250-252].

$\gamma\delta$ T-Zellen als frühe IL-17-Produzenten wurden bereits von Shibata *et al.* beschrieben. Dabei erfolgt die Expression von IL-17 im Peritonealexsudat innerhalb weniger Stunden nach i.p. Infektion mit *Escherichia coli* [139]. Auch in *Mycobacterium tuberculosis*- und *Mycobacterium bovis* (BCG Bacille Calmette-Guerin)-infizierten Mäusen konnten $\gamma\delta$ T-Zellen als IL-17-Produzenten in den Lungen charakterisiert werden [182, 248]. In einem Modell der experimentellen Sepsis wurden auch $\gamma\delta$ T-Zellen und nicht $\alpha\beta$ T-Zellen als IL-17-Produzenten identifiziert [253]. Ferner konnten in der Collagen-induzierten Arthritis (CIA) in den betroffenen Gelenken der Tiere $\gamma\delta$ T-Zellen als IL-17-Produzenten identifiziert werden [254].

Wie bereits erwähnt sind neben den $\gamma\delta$ T-Zellen auch IL-17-produzierende CD4⁺ T-Zellen in den Lungen der Influenzavirus-infizierten Tiere nachweisbar. Dabei konnte jedoch gezeigt werden, dass CD4⁺ T-Zellen zu den frühen Zeitpunkten der Infektion IL-17 unspezifisch exprimieren. Antigen-spezifische CD4⁺ T-Zellen, identifiziert durch die Expression von CD154 [186, 223], sind am Tag 3 in der Lunge nicht nachweisbar sondern erst am Tag 6 nach Infektion. CD4⁺ T-Zellen, die nach polyklonaler Restimulation IL-17 produzieren, könnten womöglich Gedächtniszellen der Lunge sein. Auch andere Gruppen konnten belegen, dass Antigen-spezifische T-Effektorzellen am Ort der Virusinfektion, also in den Atemwegen und im Lungenparenchym, erst 6 bis 7 Tage nach Influenzavirus- bzw. Parainfluenzavirus-Infektionen vorhanden sind [200, 255].

Obwohl Antigen-spezifische CD4⁺ T-Zellen über CD154 charakterisiert werden können, erfolgt in den CD8⁺ T-Zellen keine verstärkte Expression von CD154 nach Stimulation mit einem Influenzavirus-spezifischen Nukleoprotein-Peptid. Während CD8⁺ T-Zellen IFN- γ produzieren, erfolgt die Expression von IL-17 weder nach polyklonaler noch nach Antigen-spezifischer Restimulation. Hingegen konnten Hamada *et al.* IL-17-produzierende CD8⁺ T-Zellen, sogenannte Tc17-Zellen, in Influenzavirus-infizierten Mäusen nachweisen [197]. Im Gegensatz zu IFN- γ ⁺ CD8⁺ T-Zellen (= Tc1-Effektorzellen) exprimieren Tc17-Zellen kein Granzym B, Perforin und besitzen keine zytolytischen Aktivitäten. Die Injektion von Tc17 Effektorzellen in naive Mäuse schützt diese vor einer lethalen Influenzavirus Infektion. Die Autoren vermuten, dass das protektive Potential dieser Zellen in der Rekrutierung von T-Zellen, Neutrophilen und Makrophagen durch Zytokine (IL-17A, IL-17F, IL-21, TNF, IL-22) und Chemokine (CCL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13) begründet ist. Die Infiltration von Effektorzellen hat durch die Expression

von Zytokinen und durch die Lyse Virus-infizierter Zellen einen dramatischen Effekt auf die Viruslast. Neben den Zytokinen IFN- γ , TNF- α , IL-2 und IL-10 [256-258] induzieren CD8⁺ Effektorzellen die Apoptose infizierter Epithelzellen [259]. Diese Ereignisse um Tag 10 nach Infektion führen schließlich zu einer schnellen Virusbeseitigung und zu einer reduzierten Viruslast [260].

5.3.2. Die pathologische Relevanz der IL-17 – Blockade in H1N1-infizierten Mäusen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass IL-17 bereits zu frühen Zeitpunkten der Infektion in der Lunge produziert wird, sollte IL-17 als nächstes mithilfe eines Antikörpers blockiert werden. Die Applikation des Antikörpers (Klon MM17F3) [199] führt zu einem wesentlich milderem Krankheitsverlauf und zu einer geringeren Viruslast in der Lunge sowie im Falle einer lethalen Infektion zu einer reduzierten Mortalität. Um auszuschließen, dass dies nur ein Virusstamm-spezifischer Effekt ist, wurden Mäuse mit dem sublethalen Influenza A Virusstamm H3N2 infiziert. Auch in H3N2-infizierten Mäusen führt die IL-17 – Blockade zu einem milderem Krankheitsverlauf und einer geringeren Viruslast.

Gegenteilige Resultate wurden von Hamada *et al.* gezeigt [197]. C57BL/6 Mäuse wurden zunächst am Tag -35 mit H3N2, am Tag 0 mit H1N1 infiziert und schließlich mit anti-IL-17 behandelt. In diesem Fall führt die Injektion von anti-IL-17 zu einem massiven Gewichtsverlust und zu einer erhöhten Mortalität der Tiere. Die unterschiedlichen Ergebnisse der IL-17 – Blockade sind sehr wahrscheinlich auf die Art der Influenzavirus Infektion zurückzuführen. Möglicherweise wird durch die Re-Infektion mit einem zweiten Influenza A Virusstamm das Immungedächtnis aktiviert und die IL-17 – Blockade wirkt somit auf das erworbene Immunsystem.

Ähnlich der anti-IL-17-Applikation nach Primärinfektion von WT Tieren führt auch die primäre Influenzavirus Infektion in IL-17-RezeptorA-defizienten Mäusen zu einem weniger dramatischen Gewichtsverlust und zu einer reduzierten Mortalität [261]. Diese Ergebnisse wurden im Oktober 2009 publiziert und sind den in dieser Arbeit erhaltenen Resultate sehr ähnlich, da ebenfalls dem Zytokin IL-17 eine entscheidende Rolle in der Immunpathologie der Influenzavirus Infektion zugesprochen wird. In der vorliegenden Arbeit werden jedoch Wildtyp Mäuse infiziert und die Behandlung mit dem Antikörper erfolgt erst 24 h nach der Primärinfektion mit H1N1. Demzufolge hat diese Applikation einen eher therapeutischen Hintergrund. Ein entscheidender Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit liefern auch die Resultate bezüglich der Viruslast. Während Crowe *et al.* zunächst keinen Unterschied in der Viruslast zwischen den WT und IL-17RA ko Mäusen feststellen konnte [261], führte die IL-17 – Blockade mithilfe des Antikörpers zu einer reduzierten Viruslast in den Lungen der H1N1-infizierten Tiere.

Aufgrund der Wirkung der anti-IL-17-Applikation auf den Krankheitsverlauf der infizierten Mäuse wurden als nächstes mögliche Ursachen dafür analysiert. Ein wichtiger Aspekt dabei ist die stimulierende Funktion von IL-17 auf die Granulopoese, sowohl *in vitro* [153] als auch *in vivo* [80]. Die IL-17-Produktion unmittelbar nach der Infektion induziert die Mobilität neutrophiler Granulozyten durch die Produktion verschiedener Zytokine (G-CSF, GM-CSF) und Chemokine (CXCL1, CXCL2 = MIP-2, CXCL5) [82, 262]. Somit konnte bereits gezeigt werden, dass es nach einer Infektion mit *Klebsiella pneumoniae* in IL-17RA ko Mäusen zu einer verminderten Produktion der Neutrophil-mobilisierenden Faktoren CXCL2 und G-CSF und folglich zu einer verminderten Rekrutierung Neutrophiler in das Lungengewebe kommt. Die Autoren sehen darin den Grund für die eingeschränkte Wirtsabwehr und die hohe Mortalität bzw. Morbidität in diesen IL-17RA ko Tieren [178].

Die IL-17 – Blockade in Influenzavirus-infizierten Mäusen resultiert in einer eingeschränkten Infiltration neutrophiler Granulozyten in das Lungengewebe. In der dieser Arbeit wurden die neutrophilen Granulozyten mithilfe zwei verschiedener Methoden nachgewiesen – durchflusszytometrische Oberflächenfärbung und Immunhistochemische Färbung. Über die Expression von CD11b und GR-1 lassen sich Neutrophile im Durchflusszytometer identifizieren [263]. Für die Immunhistochemischen Färbungen der Lungenschnitte wurde ein weiterer Neutrophil-spezifischer Marker (Klon 7/4) verwendet [264]. Allerdings konnte 2003 nachgewiesen werden, dass dieser Neutrophil-spezifische Antikörper auch Monozyten detektiert [265]. Somit ist anhand der Immunhistochemischen Färbungen anzunehmen, dass durch die IL-17 – Blockade sowohl die Infiltration der Neutrophilen als auch die der Monozyten inhibiert ist.

Neben der reduzierten Infiltration neutrophiler Granulozyten in das Lungengewebe konnte auch eine stark reduzierte Schädigung der Lunge nach anti-IL-17-Applikation in Influenzavirus-infizierten Tieren gezeigt werden. Der Schweregrad der *Bronchiolitis obliterans* in den anti-IL-17-behandelten Mäusen ist im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant reduziert. Dies könnte auf die verringerte Anzahl an Neutrophilen zurückzuführen sein, die eventuell freie Radikale und inflammatorische Mediatoren freisetzen und so das Lungengewebe massiv schädigen. Auch in einem murinen Sepsismodell konnten ähnliche exzessive Immunreaktionen durch die Applikation des anti-IL-17-Antikörpers inhibiert werden. Dies führt zu einer höheren Überlebensrate der Tiere [253].

Die Rolle der neutrophilen Granulozyten in Influenzavirus Infektionen ist allerdings umstritten. Neutrophile sind sowohl in der pathologischen als auch in der protektiven Antwort nach einer Influenzavirus Infektion involviert. Eine Funktion der Neutrophilen während der Infektion besteht in der Adhärenz an Influenzavirus-infizierten Zellen [266] und der Phagozytosevermittlung dieser infizierten apoptotischen Zellen [267]. Tate *et al.* konnten zeigen, dass Neutrophile gegenüber einer Influenzavirus Infektion nicht suszeptibel sind: Obwohl virale RNA in neutrophilen Granulozyten nachweisbar ist, konnte kein virales NP in den Zellen detektiert werden [268]. Während in der vorliegenden Arbeit die Depletion neutrophiler Granulozyten die Lungenpathologie reduziert, wurden von Tate *et al.* gegenteilige Resultate gezeigt. Die Depletion neutrophiler Granulozyten mittels anti-GR-1 erhöht signifikant die Mortalität und Morbidität der Influenzavirus-infizierten Mäusen und führt zu einem Anstieg des Virustiters in den Lungen. Der monoklonale Antikörper anti-GR-1 (Klon RB6-8C5) erkennt sowohl Ly6G als auch Ly6C [269]. Während Ly6G spezifisch auf Neutrophilen exprimiert wird, konnte Ly6C auch auf weiteren Leukozyten wie Monozyten, DCs und CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden [270]. Demzufolge führt die Applikation des anti-GR-1-Antikörpers nicht nur zu einer Reduktion der Neutrophilen, sondern auch der CD8⁺ T-Zellen und der NK1.1⁺ Zellen [271]. Ein Jahr später wurden in Influenzavirus-infizierten Mäusen Neutrophile mit einem spezifischeren Antikörper für Ly6G (Klon 1A8) depletiert. Auch die Applikation des anti-Ly6G-Antikörpers führt zu einer erhöhten Mortalität der infizierten Tiere. Im Gegensatz zu dieser Arbeit, in der sowohl die IL-17 – Blockade, als auch die anti-GR-1-Applikation 24 h nach Infektion erfolgt, wurden in dem beschriebenen System von Tate *et al.* bereits 24 h vor der Infektion den Tieren der Antikörper anti-Ly6G appliziert. Demzufolge kommt es in unserem System zu einer Verringerung der Neutrophileninfiltration, während in der Publikation von Tate *et al.* die Applikation präventiv erfolgt [271, 272]. Darüber hinaus werden die Tiere in den genannten Publikationen von Tate *et al.* mit dem wesentlich weniger pathogenen Influenzavirus A Stamm – HKx31 (H3N2) infiziert. Im Zusammenhang mit der geringeren Schwere der *Bronchiolitis obliterans* in Neutrophil-depletierten und Influenzavirus-infizierten

Tieren zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit auch eine verminderte Gewichtsreduktion im Vergleich zur Kontrolle.

Im Kontrast zur protektiven Funktion der Neutrophilen ist zu nennen, dass diese aktivierten Zellen freie Radikale, inflammatorische Mediatoren und Proteasen produzieren können, eine massive Schädigung des Lungengewebes auslösen können [273]. Somit wurde z.B. CXCL2 in Influenzavirus-infizierten Mäusen blockiert. Als Folge dessen kommt es zu einer geringeren Infiltration Neutrophiler der Lunge und zu einer mildereren Lungenpathologie [274].

Auch in den infizierten IL-17RA ko Mäusen ist im Vergleich zu den WT Kontrolltieren eine mäßige Inflammation festzustellen [261]. Diese Entzündung bezieht sich hauptsächlich auf perivaskuläre Bereiche der Lunge, während in den Kontrolltieren schwere perivaskuläre Infiltrate zu sehen sind, die auch das Parenchym betreffen. Ähnlich der IL-17 – Blockade mithilfe eines monoklonalen Antikörpers ist die Anzahl der Neutrophilen in der Bronchoalveolären Lavage (BAL) in den Influenzavirus-infizierten IL-17RA ko Mäusen signifikant reduziert. Im Gegensatz dazu sind keine Unterschiede in der Anzahl der Makrophagen und der Lymphozyten in der BAL der WT und IL-17RA ko Mäuse festzustellen. Während in den IL-17RA ko Tieren das IL-17 *signaling* vollständig inhibiert ist, blockiert der in dieser Arbeit verwendete Antikörper ausschließlich IL-17A [199]. Auch IL-17F ist in der Lage G-CSF und CXCL1 zu induzieren [12, 275] und könnte somit Neutrophile rekrutieren ohne eine überschießende Immunreaktion auszulösen. Allerdings wurde im Rahmen dieser Arbeit IL-17F nicht mithilfe eines monoklonalen Antikörpers in H1N1-infizierten Mäusen blockiert.

5.3.3. IL-17 – Blockade reduziert die Anzahl der IFN- γ -Produzenten in H1N1-infizierten Mäusen

Die Elimination der primären Influenzavirus Infektion ist nicht nur abhängig von der angeborenen Immunabwehr sondern vielmehr ein Zusammenspiel der angeborenen und der erworbenen Immunabwehr mit CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen aber auch der humoralen Abwehr in Form von Antikörpern. CD8⁺ T-Zell-defiziente Mäuse zeigen eine verzögerte Beseitigung des Virus [260]. Ähnlich verhalten sich Influenzavirus-infizierte Mäuse nach CD4⁺ T-Zell-Depletion [276]. Auch Virus-spezifische Antikörper spielen eine wichtige Rolle, indem sie Mäuse vor einer lethalen Influenza A Virusinfektion schützen. Die Produktion neutralisierender Antikörper kann CD4-abhängig, aber auch CD4-unabhängig erfolgen [277, 278]. Die Depletion der CD4⁺ T-Zellen verursacht reduzierte Antikörpertiter und verhindert den Isotyp-Klassenwechsel [279].

Die Influenzavirus Infektion führt im Allgemeinen zu einer massiven Rekrutierung von Leukozyten in das inflammatorische Gewebe. Nach Analyse der Gesamtzellzahl an Leukozyten in den Lungen ist kein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den anti-IL-17-behandelten Tieren am Tag 4 sowie am Tag 7 nach Infektion zu sehen. Neben dem Effekt der anti-IL-17-Applikation auf das angeborene Immunsystem wurde im nächsten Schritt der Fokus auf das adaptive Immunsystem gelegt. Dabei sollte der Effekt der IL-17 – Blockade auf Lymphozyten und deren Zytokinproduktion sowie auf Influenzavirus-spezifische Antikörper untersucht werden.

Nach einer detaillierten Analyse der Zellpopulationen wurde festgestellt, dass nach anti-IL-17-Applikation sowohl die Anzahl der CD8⁺ T-Zellen als auch die der NK-Zellen in den Lungen stark verringert ist. Dieser Effekt wird jedoch erst am Tag 7 nach Infektion sichtbar. Die verringerte Anzahl an CD8⁺ T-Zellen korreliert mit der reduzierten Immunpathologie, da auch CD8⁺ T-Zellen zur Schädigung der Lunge

beitragen können. In T-Zell-defizienten Mäusen (nu/nu Mäuse oder T-Zell-Defizienz durch Bestrahlung) kommt es zur Verzögerung der Lungenpathologie und des Exitus [280, 281]. Der Effekt der CD8⁺ T-Zellen steht dabei in einem direkten Zusammenhang mit der Infektionsdosis. Während in Infektionen mit einer niedrigen Virusdosis CD8⁺ T-Zellen vorwiegend über eine protektive Funktion verfügen, kommt es in Infektionen mit einer hohen Virusdosis zu einer schweren Pathologie und einer erhöhten Mortalität [282]. Obwohl nach anti-IL-17-Applikation eine reduzierte Anzahl an CD8⁺ T-Zellen in Influenzavirus-infizierten Mäusen nachgewiesen werden konnte, sind keine Unterschiede in der Anzahl der NP- und HA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen zwischen H1N1-infizierten IL-17RA ko und WT Tieren zu verzeichnen [261]. In den Milzen der anti-IL-17-behandelten Tiere ist am Tag 7 p.i. lediglich eine erhöhte Anzahl an CD4⁺ T-Zellen zu beobachten. In Bezug auf die CD8⁺ und $\gamma\delta$ T-Zellen sowie NK-Zellen sind keine Unterschiede in den Milzen zwischen den Gruppen zu verzeichnen. Womöglich erfolgt die Aktivierung und Proliferation dieser Zellen nicht in der Milz, sondern in den entsprechenden Lymphknoten – in den zervikalen bzw. mediastinalen Lymphknoten.

Schließlich wurden auch die Expression von Zytokinen untersucht, wobei die Aufmerksamkeit auf IFN- γ , IL-17 und IL-10 gerichtet wurde. Bekannt ist, dass CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in der Lunge vorwiegend IFN- γ , TNF- α , IL-2 und IL-10 produzieren [200]. IFN- γ besitzt in viralen Systemen wie *Vacciniavirus*, *Herpes simplex Virus*, *Cytomegalievirus* und *Lymphozytäres Choriomeningitisvirus* eine protektive Rolle [283]. Mehrere Publikationen zeigen jedoch, dass IFN- γ für die effektive Elimination des Influenzavirus sowie für die wirksame Immunantwort gegen das Virus nur von geringer Bedeutung ist [284-286]. Der prozentuale Anteil der IFN- γ -produzierenden CD4⁺, CD8⁺, $\gamma\delta$ T-Zellen und NK1.1⁺ Zellen in der Lunge unterscheidet sich nicht zwischen der Kontrollgruppe und den anti-IL-17-behandelten Tieren. Allerdings ist die absolute Anzahl der IFN- γ -produzierenden CD8⁺ T- und NK1.1⁺ Zellen in der anti-IL-17-behandelten Gruppe reduziert, was auf die geringere Anzahl dieser Zellen in der Lunge zurückzuführen ist. Auch in IL-17RA ko Mäusen konnte im Vergleich zu WT Tieren am Tag 6 nach Influenzavirus Infektion ein reduziertes IFN- γ Menge in Lungenzellhomogenaten nachgewiesen werden [261].

IL-10 als anti-inflammatorisches Zytokin blockiert die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine sowie die Expression der MHC-II Moleküle. Sun *et al.* konnten nachweisen, dass IL-10, produziert von Virus-spezifischen T-Effektorzellen, in Mäusen pulmonale Läsionen verhindert [287]. IL-10-defiziente Mäuse zeigen im Vergleich zu WT Tieren nach Influenzavirus Infektion eine bessere Virusbeseitigung und eine geringere Mortalität. In der vorliegenden Arbeit wird IL-10 hauptsächlich von CD8⁺ T-Zellen produziert. Zusätzlich konnten sowohl IL-10-produzierende CD4⁺ T-Zellen als auch NK1.1⁺ Zellen in den Lungen identifiziert werden. Die Blockade von IL-17 führt jedoch nicht zu einem Anstieg der IL-10-produzierenden Zellen. Folglich sind die geringen pulmonalen Läsionen in den Lungen der infizierten Mäuse nach anti-IL-17-Applikation nicht auf eine erhöhte Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 zurückzuführen.

Neben IFN- γ und IL-10 wurde auch die Expression von IL-17 untersucht. Die IL-17-Produzenten sind quantitativ in der Lunge eher gering vertreten. Die IL-17-produzierenden CD8⁺ T-Zellen sind mit einem Anteil von 6000 Zellen in der Lunge am häufigsten vorhanden, während die IL-17-produzierenden CD4⁺ und $\gamma\delta$ T-Zellen sowie NK1.1⁺ Zellen mit einer Zahl von lediglich jeweils 2000 weniger vorkommen. Interessanterweise wird durch die IL-17 – Blockade die IL-17-Expression in den untersuchten Zellpopulationen - mit Ausnahme der CD8⁺ T-Zellen - hochreguliert. Eventuell wird die Blockade von IL-

IL-17 mit dem Antikörper durch eine verstärkte Expression des Zytokins in den Zellen kompensiert. Auch in IL-17RA ko Mäusen konnte in der bronchoalveolären Lavage ein erhöhtes Niveau an IL-17 nachgewiesen werden [288]. Während IL-17 hauptsächlich mit Gewebeschäden assoziiert wird, wurde in einer chronischen Virusinfektion (*Theiler's murines Encephalomyelitis Virus*) in Mäusen IL-17 als anti-inflammatorisches Zytokin beschrieben [183].

Aufgrund der nach Infektion auftretenden frühen Effekte nach anti-IL-17-Applikation, wie z.B. Inhibition der Infiltration neutrophiler Granulozyten, ist die Ursache in diesem System für den milderen Krankheitsverlauf nicht ausschließlich in der erhöhten Anzahl an IL-17-produzierenden CD4⁺ T-Zellen begründet. Eventuell trägt die späte Produktion von IL-17 durch T-Effektorzellen zu dem milderen Krankheitsverlauf in anti-IL-17-behandelten H1N1-infizierten Mäusen bei.

Für die Beseitigung von Influenzaviren nach einer primären Infektion, vor allem mit einem hochpathogenen Virus, ist die B-Zellantwort mit der Produktion Virus-spezifische Antikörper essentiell [200]. Ein direkter Vergleich von B-Zell-defizienten und IgM-defizienten Mäusen führte zu dem Ergebnis, dass B-Zell-defiziente Mäuse eine höhere Suszeptibilität gegenüber Influenzavirus Infektionen besitzen [289]. Für die optimale Virusbeseitigung und den Antikörper-vermittelten Schutz ist daher die Produktion neutralisierender Virus-spezifischer Antikörper verschiedener Isotypen erforderlich [290]. Der Nachweis der Influenza-spezifischen Antikörper zeigt, dass infolge der IL-17 – Blockade diese jedoch nicht beeinflusst werden. Zwischen der Kontroll- und der anti-IL-17-behandelten Gruppe sind keine deutlichen Unterschiede festzustellen.

5.3.4. Die Bedeutung der antiviralen Proteine in H1N1-infizierten Mäusen nach IL-17 – Blockade

Nachdem in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die anti-IL-17-Applikation die Schwere der Influenza reduziert, zu einer geringeren Viruslast führt und die Rekrutierung von Zellen des angeborenen sowie des erworbenen Immunsystems inhibiert, bleibt die Frage nach der Ursache offen. Die Genomanalyse mithilfe des *Whole Genome* Microarrays sollte Aufschluss darüber geben, welche Gene involviert sein könnten. Obwohl der IL-17R mit einer hohen Frequenz ubiquitär in hämatopoetischen Geweben exprimiert wird [291], gab es keine Hinweise auf welche Zellen in dem hier verwendeten System IL-17 die bedeutenste Wirkung hat. Da außer Epithel- und Endothelzellen, Fibroblasten und Astrozyten auch Makrophagen, DCs und Neutrophile den IL-17R exprimieren können [82, 292, 293], wurde mittels der Genexpressionsanalyse Zellen der gesamten Lunge untersucht.

Während der Infektion wird in den Zellen des Wirtes eine Reihe von Reaktionen ausgelöst, um die Ausbreitung des Virus zu verhindern. Verschiedenen Transkriptionsfaktoren werden aktiviert, die wiederum die Produktion von Zytokinen und Chemokinen auslösen. Während Chemokine Zellen in das inflammatorische Gewebe rekrutieren, aktivieren Zytokine die antivirale Wirtsabwehr. Auch die Antigenpräsentation durch APCs sowie diverse Apoptosewege werden aktiviert [294].

Die geringere Anzahl an Zellen des angeborenen sowie des erworbenen Immunsystems in den Lungen der H1N1-infizierten Tiere nach anti-IL-17-Applikation, lässt vermuten, dass Gene für Chemokine oder Chemokinrezeptoren herunterreguliert sind. So werden z.B. von Epithelzellen CCL5 (RANTES), CCL2 (MCP-1) und IL-8 als Antwort auf die Influenzavirus Infektion produziert [295, 296]. Hingegen exprimieren Influenza A Virus-infizierte Monozyten und Makrophagen CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), CCL5, CCL2, CCL7 (MCP-3), CCL20 (MIP-3 α) und CXCL10 (IP-10) [297, 298]. Auch in Patienten kommt es nach einer

Influenzavirus Infektion zu einer verstärkten Zytokinausschüttung [299, 300]. Die Ingenuity Software für die Auswertung der Microarrays gibt Tabellen mit sogenannten *Top Canonical Pathways* und *Top Molecules* an. In der Software sind verschiedene Gene in definierte Signalwege zusammen gefasst. Unter den *Top Canonical Pathways* findet man die Signalwege, in denen die meisten Gene hoch- bzw. herunterreguliert sind. Unter den *Top Molecules* findet man die einzelnen Gene, die entsprechend hoch- bzw. herunterreguliert sind.

Obwohl die Analyse mithilfe der Ingenuity Software den definierten Signalweg „*Role of Hypercytokinemia / Hyperchemokinemie in the Pathogenesis of Influenza*“ als auffällig herausstellte (d.h. das viele Gene, die für die verstärkte Zytokin- bzw. Chemokinausschüttung in der Pathogenese der Influenzavirusinfektion verantwortlich sind, hoch- bzw. herunterreguliert sind), konnte unter den *Top Molecules* keine dieser Kandidatengene für Chemokine bzw. Chemokinrezeptoren identifiziert werden.

Interferone sind ein sehr wichtiger Bestandteil dieser antiviralen Antwort [242]. Die IFN-Stimulation induziert über 2000 Genprodukte, wie z.B. Mx, PKR, RIG-I und 2'5'-OAS [242, 301, 302]. Mx Proteine gehören zu der Klasse der GTPasen und sind im intrazellulären Vesikeltransport involviert [303]. Die am besten untersuchten antiviralen Proteine neben dem Mx Protein sind 2',5' Oligoadenylat Synthetase (2'5'-OAS) und die dsRNA-abhängige Proteinkinase (PKR) [304-306]. 2'5'-OAS und PKR werden konstitutiv als latente, inaktive Form in Zellen exprimiert und durch virale dsRNA aktiviert. RIG-I (Retinonsäure-induzierbare Gene I) zählt zu den sogenannten *pattern recognition receptors*, die molekulare Muster von Pathogenen erkennen und dadurch die angeborene Immunabwehr auslösen. Doch auch diese genannten antiviralen Gene sind in den anti-IL-17-behandelten Tieren nicht signifikant verstärkt exprimiert bzw. zählen nicht zu den *Top Molecules*. Hingegen werden in den Tieren nach anti-IL-17-Applikation IFITM3, IFI35 und TIMP1 im Vergleich zu den Kontrolltieren hochreguliert. Obwohl es im Allgemeinen wenig Unterschiede auf transkriptioneller Ebene zwischen beiden Gruppen gibt, sind die meisten Unterschiede bereits am Tag 2 nach Infektion zu finden. Somit scheint die IL-17 – Blockade die ersten Schritte in der Virusabwehr zu beeinflussen.

Die Interferon-induzierbaren Transmembranproteine IFITM1, 2 und 3 schränken die ersten Schritte der Influenza A Virusreplikation ein. Die mRNA-Expression von IFITM1, 2 und 3 werden sowohl durch IFN Typ I (α) als auch Typ II (γ) induziert [307, 308]. Während in unstimulierten Zellen IFITM3 im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist, erfolgt nach IFN-Stimulation die Verteilung des Proteins in der gesamten Zelle [201]. In Huhn-Fibroblastenzellen konnte gezeigt werden, dass IFITM sehr früh im viralen Lebenszyklus eingreift – wahrscheinlich schon während der Bindung des Virus an die Wirtszelle und während des Eintritts der viralen RNA in das Zytosol. Auch im murinen System ist IFITM in die Infektionsabwehr integriert. So konnte in murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs), in denen alle *ifitm* Gene deletiert sind, eine erhöhte Virusreplikation nachgewiesen werden [201]. In Bezug auf die Microarray Daten würde die erhöhte IFITM3-Expression in den Lungen der anti-IL-17-behandelten Tiere die reduzierte Viruslast erklären können.

Das *ifi35* Gen kodiert für das Interferon-induzierbare Protein (IFP35). Die Induktion von IFIP35 erfolgt durch IFN- α/β in verschiedenen Zellen wie Fibroblasten, Monozyten, Makrophagen und Epithelzellen. Nach IFN-Stimulation transloziert das Protein vom Zytoplasma in den Nukleus [309]. Während der Infektion von Zelllinien mit einem bovinen Foamyvirus verhindert IFIP35 die virale Replikation und unterdrückt somit die virale Transkription [310]. Eventuell könnte auch in unserem Mausmodell IFIP35 die

virale Replikation inhibieren und so - wie IFITM3 - zu einer niedrigeren Viruslast in der Lunge der anti-IL-17-behandelten Mäuse beitragen.

Die Hauptfunktion von TIMP1 (*Tissue inhibitor of metalloproteinases 1*) ist die Degradierung der Matrix Metalloproteinasen (MMPs), die wiederum Komponenten der Extrazellulären Matrix zerstören. Die übermäßige Expression der MMPs führt zu gewebeerstörenden Prozessen in verschiedenen Krankheiten, u.a. auch in Lungenerkrankungen [311]. Eventuell könnte die Hochregulation von TIMP1 nach anti-IL-17-Applikation zu der reduzierten Schädigung des Lungengewebes führen. Es wird bereits diskutiert, ob MMP-Inhibitoren eine therapeutische Rolle in Lungenerkrankungen einnehmen können [312]. 2009 wurde ein Zusammenhang zwischen TIMP1 und IL-17 beschrieben. Allerdings wurde in dieser Publikation gezeigt, dass in MEFs die TIMP1 mRNA-Expression durch die Stimulation mit IL-17 erhöht wird [313]. Dies steht im Widerspruch zu den Resultaten dieser Arbeit, in der TIMP1 durch die IL-17 – Blockade hochreguliert wird. Dabei ist jedoch zu beachten, dass es sich um ein *in vitro* System handelt [313] und im Falle dieser Arbeit um ein Infektionsmodell.

5.3.5. Influenza Virusinfektion in IL-17 *knockout* Mäusen

Als Vergleich zur IL-17 – Blockade mittels eines monoklonalen Antikörpers sollte zusätzlich eine Influenzavirus Infektion in C57BL/6_IL-17 ko Mäusen ausgelöst werden. Die C57BL/6_IL-17 ko Mäusen wurden 2002 von Nakae *et al.* generiert und besitzen einen Defekt im IL-17A Genlocus [84]. Der klinische Verlauf zeigt, dass IL-17 ko Tiere einen ähnlichen Krankheitsverlauf nach Infektion zeigen wie die WT Kontrollgruppe. Ähnlich den Kontrolltieren ist ein hoher Gewichtsverlust sowie eine hohe Mortalität bei den IL-17-defizienten Tieren zu verzeichnen. Im Gegensatz zur anti-IL-17-Applikation ist überraschenderweise in den Influenzavirus-infizierten C57BL/6_IL-17 ko Mäusen mittels Immunhistofärbung eine Infiltration neutrophiler Granulozyten festzustellen. In der Publikation von Vietinghoff *et al.* konnte gezeigt werden, dass *in vivo* die Abwesenheit von IL-17A die Produktion von IL-17F hochreguliert wird. IL-17F besitzt ähnliche Funktionen wie IL-17A und ist demzufolge auch in der Lage G-CSF und somit die Granulopoese zu induzieren [314]. Darüber hinaus besitzen IL-17A und IL-17F eine 50%ige Aminosäuresequenzhomologie und werden außerdem vom gleichen Rezeptorkomplex, bestehend aus IL-17RA und IL-17RC, erkannt [93]. In einer weiteren Publikation wird IL-17F als besserer Auslöser für die Rekrutierung Neutrophiler in einem Modell der akuten allergischen Reaktion der Luftwege, ausgelöst durch ein Allergen, beschrieben [222]. Somit könnte es möglich sein, dass in den IL-17A ko Tieren IL-17F die Funktion von IL-17A übernimmt und die Infiltration der Neutrophilen auslöst. Aus diesem Grund könnte der Vergleich zwischen der IL-17 – Blockade mittels Antikörper und den C57BL/6_IL-17 ko Mäusen nach H1N1-Infektion problematisch sein.

5.3.6. IL-17 – Blockade in einer Koinfektion von Influenza A Virus und *Streptococcus pneumoniae*

Sekundäre bakterielle Infektionen werden oft durch pulmonale Virusinfektionen ausgelöst und sind ein häufiger Grund für schwere humane Erkrankungen. Die beiden Pathogene Influenza Virus und *Streptococcus pneumoniae* sind für die Mehrzahl der respiratorischen Erkrankungen im Mensch verantwortlich. Während eine Influenza Infektion eine Pneumonie auslösen kann, führen sekundär bakterielle Infektionen, v.a. in Influenza Pandemien wie 1918-1919, zu einer dramatisch erhöhten Morbidität und Mortalität. Aufgrund dieses physiologisch relevanteren Modells wurden Mäuse mit H1N1 und *Streptococcus pneumoniae* (Serotyp 3, Stamm NCTC7978) infiziert sowie anti-IL-17 entsprechend

appliziert. Diese Superinfektion führt in Mäusen zu einer erhöhten Mortalität [203] und reduziert die bakterielle Elimination in der Lunge [315]. Pathologische Analysen in Mäusen nach sekundär bakteriellen Infektionen konnten schwere Bronchopneumonien mit massiven Hämorrhagien zeigen. Inflammatorische Zytokine und Chemokine wie TNF- α , IL-6, CXCL2 und CCL5 sind in den Lungen koinfizierter Mäuse signifikant erhöht [202]. Die Influenzavirus Infektion erhöht die Suszeptibilität gegenüber der sekundär bakteriellen Infektion durch die Veränderung der bakteriellen Adhärenz [316], der TLR-Expression [317, 318] und der *Pattern-Recognition Receptors* auf Epithelzellen [319]. Die Induktion von Typ I und II IFN durch Influenza A inhibiert die Elimination der bakteriellen Pneumonie in Mäusen [203, 320].

Die IL-17 – Blockade hat keinen Effekt auf das Überleben der Tiere nach der Koinfektion mit H1N1 und *S.pneumoniae*. Sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der anti-IL-17-behandelten Gruppe ist eine Mortalität von 100 % zu verzeichnen, welche mit einer dramatischen Reduktion des Körpergewichts und der –temperatur korreliert. Dabei wurden sowohl für die Primärinfektion mit H1N1 als auch für die Sekundärinfektion mit *S.pneumoniae* sehr niedrige Infektionsdosen verwendet.

Verschiedene Publikationen beweisen, dass IL-17 für die Immunantwort gegen bakterielle pneumonale Infektionen eine protektive Funktion besitzt [321, 322]. Kudva *et al.* konnten zeigen, dass die Koinfektion mit einem Virus und *S.aureus* zu einer reduzierten IL-17- IL-22- und IL-23-Produktion führt [323] und demzufolge zu einer erhöhten Inflammation. Vermutlich ist die Funktion von IL-17 für die Bekämpfung der sekundär bakteriellen Infektion wichtiger als für die reduzierte Schädigung der Lungen in H1N1-infizierten Tieren nach anti-IL-17-Applikation. Darüber hinaus bietet das Modell der Koinfektion viele Parameter, die verändert und optimiert werden könnten, so z.B. die Infektionsdosis und die Zeitspanne zwischen der Primär- und der Sekundärinfektion. Demzufolge ist es schwierig hier eine konkrete Aussage über die Bedeutung der IL-17 – Blockade in einer Koinfektion zu treffen.

5.4. Ausblick

Aufgrund der Funktion von T_H17-Zellen ist die Analyse dieser Zellen ein wichtiger Forschungsschwerpunkt. Verschiedene Publikationen konnten zeigen, dass diese proinflammatorischen Zellen das Potential besitzen in andere Zelltypen zu konvertieren. Dies bietet sehr gute Ansätze für die Entwicklung von Therapiestrategien, z.B. in Autoimmunerkrankungen. Dabei spielt jedoch das Umfeld der Zellen eine entscheidende Rolle. Aus diesem Grund ist es notwendig die Mechanismen zu untersuchen und zu verstehen, d.h. welche Faktoren für die Konvertierung der T_H17-Zellen erforderlich sind. Möglicherweise unterscheiden sich die Faktoren in Bezug auf die Art der Erkrankung, das Organ und eventuell auch auf den Zeitpunkt.

Obwohl IL-17 als protektives Zytokin in der Immunantwort gegen extrazelluläre Erreger beschrieben wurde, gibt es jetzt Beweise, dass IL-17 auch eine Rolle in der Immunabwehr gegen intrazelluläre Pathogene spielt. Die IL-17 – Blockade führt zu einem wesentlich mildereren Krankheitsverlauf in H1N1-infizierten Mäusen. Die Genomanalyse liefert die ersten Hinweise, welche Gene durch die IL-17 – Blockade in H1N1-infizierten Tieren hoch- bzw. herunterreguliert werden. Der nächste Schritt wäre die Aufklärung des Mechanismus, d.h.: Auf welche Zellen wirkt die IL-17 – Blockade? Besitzt die IL-17 – Blockade einen direkten oder indirekten Effekt auf die Zellen? Welche Signalwege werden durch die IL-17 – Blockade in den Zellen aktiviert oder auch inhibiert? Zum Zeitpunkt, in der die experimentellen Arbeiten durchgeführt wurden, war kein IL-17F-Antikörper verfügbar. Aufgrund der ähnlichen Funktion von IL-17A und IL-17F im Immunsystem ist es sinnvoll in Influenzavirus-infizierten Mäusen IL-17F und

sowohl IL-17A als auch IL-17F zu blockieren. Eine weitere Möglichkeit wäre die Infektion von IL-17A und IL-17F Doppel *knockout* Mäusen. Die Beantwortung dieser Fragen würde zu einem besseren Verständnis der Funktion von IL-17 in Virusinfektionen führen.

Summary

T_H cells are classified via their expression of cytokines and transcription factors. Although IL-17-producing CD4⁺ T cells were already identified for a longer time the notation “T_H17 cells” was initially published in 2005. While T_H17 cells have a pathogenic function in autoimmune diseases they are also protective in several bacterial infections. To design of therapeutic regimens a deep knowledge about their stability and plasticity is essential.

In the present work the stability and plasticity of T_H17 cells *in vitro* were analysed at first. Thereby, it was shown that T_H17 cells are not stable *in vitro* – only under T_H17-stabilized conditions (TGF- β , IL-6, anti-IFN- γ , anti-IL-4). Continued cultivation of T_H17 cells that were kept under T_H17-stabilized conditions and subsequently kept under alternative conditions (T_H1 conditions: IL-12 and anti-IL-4), resulted in the induction of IFN- γ expression as well as the loss of IL-17 expression.

Next, the stability and plasticity of T_H17 cells *ex vivo* was analysed. Therefore, typical T cell-mediated autoimmune models as the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) – used as a model for the human disease multiple sclerosis – and Glucose 6 phosphate isomerase- (G6PI-) induced arthritis were used. In both autoimmune diseases T_H17 cells show a protective role. T_H17 cells *ex vivo* EAE- or G6PI-immunized mice lose the IL-17 expression under well-defined conditions. By contrast an increase of IL-17/IFN- γ double producers as well as of IFN- γ single producers is detectable. The results show that T_H17 cells are plastic *in vivo* and are able to convert into T_H1/T_H17 cells as well as T_H1 cells.

Beside the analysis of T_H17 cells the function of the cytokine IL-17 in an influenzavirus infection model was investigated in the second part of this work. Cells of the adaptive immune system – in particular $\gamma\delta$ T cells – express IL-17 immediately after infection with A/PR/8/34 (H1N1) and recruit inflammatory cells into the lung tissue. Blockade of IL-17 with an antibody (clone MM17F3) results in a milder course of disease and in a reduced viral load in the lungs of infected mice. Furthermore, anti-IL-17 application inhibits the infiltration of neutrophils into the lung tissue and induces a reduced immune pathology as well as less numbers of IFN- γ -producing CD8⁺ T and NK1.1⁺ cells.

Microarray analysis was used to show that at the transcriptional level the mRNA expression for antiviral proteins in the lungs of anti-IL-17-treated mice was increased compared to control mice. This could be the reason for the reduced viral load, for improved immune defense and therefore for few mortality.

Additionally, IL-17 knockout mice were infected with H1N1. In contrast to the anti-IL-17 application, infection of these mice showed a comparable course of disease to the control mice.

Since under physiological conditions secondary bacterial infections result in an increase of mortality, the cytokine IL-17 was blocked after coinfection with H1N1 and *Streptococcus pneumoniae*. Also after secondary bacterial infection the anti-IL-17 application did not increase the survival of mice.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
A	Absorption (Extinktion) von Licht
Abb.	Abbildung
AG	Antigen
AhR	Arylhydrocarbon Rezeptor
AIA	Antigen-induzierte Arthritis
AK	Antikörper
APC	<i>antigen presenting cell</i> (dt. Antigen-präsentierende Zelle)
BCA	Bicinchoninsäure 2,2'-Bichonolyl-4,4'-dicarbonsäure
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (dt. Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCR	Chemokinrezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CIA	Collagen-induzierte Arthritis
CO ₂	Kohlendioxid
CTLA-8	<i>cytotoxic T lymphocyte antigen</i>
d.h.	das heißt
DC	Dendritische Zelle
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (dt. Desoxyribonucleinsäure)
DRFZ	Deutsches Rheumaforschungszentrum
ds	doppelsträngig
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
EBI3	<i>Epstein-Barr virus-induced gene 3</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	engl.:enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	Fötales Kälberserum
Foxp3	Forkhead-Box-Protein 3
FSC	<i>forward scatter</i> (dt. Vorwärtsstreulicht)
g	relative Zentrifugalbeschleunigung (1 g = 9,81 m/s)
G6PI	Glucose-6-phosphat Isomerase
G-CSF	<i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i>
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethansulfonsäure
HLA	<i>humane leukocyte antigen</i>
hu	human
HVS 13	Herpesvirus Saimiri Gen 13
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IBD	<i>inflammatory bowel disease</i>
IFI35	<i>Interferon-induced protein 35</i>
FITM3	<i>Interferon-induced transmembran protein 3</i>
IFN-γ	Interferon-γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-17R	IL-17-Rezeptor
iono	ionomycin
IRF	<i>interferon regulatory factor 4</i>
ISRE	<i>Interferon-stimulated response element</i>

IVTK	Institut für Versuchstierkunde
kDa	Kilodalton
KM	Kulturmedium
ko	<i>knockout</i>
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
LTi	<i>lymphoid tissue inducer</i>
M	molar (Mole pro Liter)
m	murin
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>
MAPK	Mitogen-aktivierenden Proteinkinase
MEFS	<i>Mouse Embryonic Fibroblasts</i> (dt. Murine Embryonalfibroblasten)
mg	Milligramm
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (dt. Haupthistokompatibilitätskomplex)
min	Minute
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i>
ml	Milliliter
MOG	Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein
mRNA	<i>messenger Ribonucleic acid</i>
MS	Multiple Sklerose
NA	Neuraminidase
NaCl	Natriumchlorid
NF κ B	<i>nuclear factor of κ light chain enhancer in B cells</i>
NK T-Zelle	Natürliche Killer T-Zellen
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
NP	Nukleoprotein
OD	Optische Dichte
o-PD	o-Phenylendiamin
OVA	Ovalbumin
p.i.	post infectionem
PBA	PBS-BSA-Azid
PBS	phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (dt. Polymerase-Kettenreaktion)
pg	Pikogramm
PI	Propidium-Iodid
PLP	Proteolipid Protein
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
POD	Peroxidase
PRR	<i>Pattern-Recognition Receptors</i>
PTX	Pertussistoxin
r	rekombinant
RA	Rheumatoide Arthritis
RANKL	<i>receptor activator of nuclear factor κ B ligand</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (dt. Ribonukleinsäure)
ROR	<i>orphan nuclear receptor</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i> (dt. Umdrehungen pro Minute)
RPMI-1640	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
s.o.	siehe oben
SA	Streptavidin
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SLE	Systemischer Lupus erythematosus
SOCS	<i>suppressor of cytokine signalling</i>
SSC	<i>sideward scatter</i> (dt. Seitwärtsstreulicht)
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
Tab.	Tabelle
T-bet	<i>T-box expressed in T cells</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i>

TCA	Trichloressigsäurel
TCDD	2,3,7,8-tetrachloridbenzo-p-dioxin
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i>
T _H -Zelle	T-Helferzelle
TIMP1	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRAF	<i>TNFR-associated factor</i>
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
TZR	T-Zellrezeptor
U	<i>units</i>
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
USP18	<i>Ubiquitin-specific peptidase 18</i>
V	Volt
v/v	Volumen pro (Gesamt-) Volumen
w/v	Masse pro (Gesamt-) Volumen
w/w	Masse pro (Gesamt-) Masse
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

Literaturverzeichnis

1. Mosmann, T.R. and R.L. Coffman, *TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties*. Annu Rev Immunol, 1989. **7**: p. 145-73.
2. Coffman, R.L. and J. Carty, *A T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon-gamma*. J Immunol, 1986. **136**(3): p. 949-54.
3. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. J Immunol, 1986. **136**(7): p. 2348-57.
4. Sakaguchi, S., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases*. J Immunol, 1995. **155**(3): p. 1151-64.
5. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. Science, 2003. **299**(5609): p. 1057-61.
6. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 330-6.
7. Khattri, R., et al., *An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 337-42.
8. Bluestone, J.A. and A.K. Abbas, *Natural versus adaptive regulatory T cells*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(3): p. 253-7.
9. Infante-Duarte, C., et al., *Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells*. J Immunol, 2000. **165**(11): p. 6107-15.
10. Park, H., et al., *A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1133-41.
11. Harrington, L.E., et al., *Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1123-32.
12. Yao, Z., et al., *Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor*. Immunity, 1995. **3**(6): p. 811-21.
13. Vinuesa, C.G., et al., *Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(11): p. 853-65.
14. Breitfeld, D., et al., *Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production*. J Exp Med, 2000. **192**(11): p. 1545-52.
15. Veldhoen, M., et al., *Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset*. Nat Immunol, 2008. **9**(12): p. 1341-6.
16. Trifari, S., et al., *Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells*. Nat Immunol, 2009. **10**(8): p. 864-71.
17. Murphy, E., et al., *Reversibility of T helper 1 and 2 populations is lost after long-term stimulation*. J Exp Med, 1996. **183**(3): p. 901-13.
18. Bird, J.J., et al., *Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle*. Immunity, 1998. **9**(2): p. 229-37.
19. Grogan, J.L., et al., *Early transcription and silencing of cytokine genes underlie polarization of T helper cell subsets*. Immunity, 2001. **14**(3): p. 205-15.

20. Aarvak, T., et al., *IL-17 is produced by some proinflammatory Th1/Th0 cells but not by Th2 cells*. J Immunol, 1999. **162**(3): p. 1246-51.
21. Annunziato, F., et al., *Phenotypic and functional features of human Th17 cells*. J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1849-61.
22. Veldhoen, M., et al., *TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells*. Immunity, 2006. **24**(2): p. 179-89.
23. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 235-8.
24. Mangan, P.R., et al., *Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 231-4.
25. Ghoreschi, K., et al., *Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling*. Nature. **467**(7318): p. 967-71.
26. Taga, T. and T. Kishimoto, *Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 797-819.
27. Samoilova, E.B., et al., *IL-6-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: roles of IL-6 in the activation and differentiation of autoreactive T cells*. J Immunol, 1998. **161**(12): p. 6480-6.
28. Okuda, Y., et al., *IL-6-deficient mice are resistant to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis provoked by myelin oligodendrocyte glycoprotein*. Int Immunol, 1998. **10**(5): p. 703-8.
29. Mendel, I., et al., *Interleukin-6 functions in autoimmune encephalomyelitis: a study in gene-targeted mice*. Eur J Immunol, 1998. **28**(5): p. 1727-37.
30. Eugster, H.P., et al., *IL-6-deficient mice resist myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis*. Eur J Immunol, 1998. **28**(7): p. 2178-87.
31. Boe, A., et al., *Interleukin 6 knock-out mice are resistant to antigen-induced experimental arthritis*. Cytokine, 1999. **11**(12): p. 1057-64.
32. Zhou, L., et al., *TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function*. Nature, 2008. **453**(7192): p. 236-40.
33. Zhou, L., et al., *IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways*. Nat Immunol, 2007. **8**(9): p. 967-74.
34. Yang, X.O., et al., *STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells*. J Biol Chem, 2007. **282**(13): p. 9358-63.
35. Oppmann, B., et al., *Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12*. Immunity, 2000. **13**(5): p. 715-25.
36. Murphy, C.A., et al., *Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1951-7.
37. Parrish-Novak, J., et al., *Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function*. Nature, 2000. **408**(6808): p. 57-63.
38. Korn, T., et al., *IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells*. Nature, 2007. **448**(7152): p. 484-7.
39. Wei, L., et al., *IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner*. J Biol Chem, 2007. **282**(48): p. 34605-10.

40. Nurieva, R., et al., *Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells*. Nature, 2007. **448**(7152): p. 480-3.
41. Sutton, C., et al., *A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis*. J Exp Med, 2006. **203**(7): p. 1685-91.
42. Chung, Y., et al., *Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling*. Immunity, 2009. **30**(4): p. 576-87.
43. McAllister, F., et al., *Role of IL-17A, IL-17F, and the IL-17 receptor in regulating growth-related oncogene-alpha and granulocyte colony-stimulating factor in bronchial epithelium: implications for airway inflammation in cystic fibrosis*. J Immunol, 2005. **175**(1): p. 404-12.
44. Jones, C.E. and K. Chan, *Interleukin-17 stimulates the expression of interleukin-8, growth-related oncogene-alpha, and granulocyte-colony-stimulating factor by human airway epithelial cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2002. **26**(6): p. 748-53.
45. Pflanz, S., et al., *IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells*. Immunity, 2002. **16**(6): p. 779-90.
46. Lucas, S., et al., *IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4+ T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(25): p. 15047-52.
47. Pflanz, S., et al., *WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27*. J Immunol, 2004. **172**(4): p. 2225-31.
48. Batten, M., et al., *Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells*. Nat Immunol, 2006. **7**(9): p. 929-36.
49. Stumhofer, J.S., et al., *Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system*. Nat Immunol, 2006. **7**(9): p. 937-45.
50. Niedbala, W., et al., *IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells*. Eur J Immunol, 2007. **37**(11): p. 3021-9.
51. Collison, L.W., et al., *The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function*. Nature, 2007. **450**(7169): p. 566-9.
52. Laurence, A., et al., *Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation*. Immunity, 2007. **26**(3): p. 371-81.
53. Davidson, T.S., et al., *Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells*. J Immunol, 2007. **178**(7): p. 4022-6.
54. Setoguchi, R., et al., *Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization*. J Exp Med, 2005. **201**(5): p. 723-35.
55. Zheng, S.G., et al., *IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4+CD25- cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells*. J Immunol, 2007. **178**(4): p. 2018-27.
56. Jetten, A.M., *Recent advances in the mechanisms of action and physiological functions of the retinoid-related orphan receptors (RORs)*. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2004. **3**(4): p. 395-412.
57. Eberl, G. and D.R. Littman, *The role of the nuclear hormone receptor RORgamma in the development of lymph nodes and Peyer's patches*. Immunol Rev, 2003. **195**: p. 81-90.

58. Eberl, G., et al., *An essential function for the nuclear receptor RORgamma(t) in the generation of fetal lymphoid tissue inducer cells*. Nat Immunol, 2004. **5**(1): p. 64-73.
59. Sun, Z., et al., *Requirement for RORgamma in thymocyte survival and lymphoid organ development*. Science, 2000. **288**(5475): p. 2369-73.
60. Eberl, G. and D.R. Littman, *Thymic origin of intestinal alphabeta T cells revealed by fate mapping of RORgammat+ cells*. Science, 2004. **305**(5681): p. 248-51.
61. Ivanov, I.I., et al., *The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells*. Cell, 2006. **126**(6): p. 1121-33.
62. Chen, Z., et al., *Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(21): p. 8137-42.
63. Yang, X.O., et al., *T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma*. Immunity, 2008. **28**(1): p. 29-39.
64. Harris, T.J., et al., *Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity*. J Immunol, 2007. **179**(7): p. 4313-7.
65. Matsuyama, T., et al., *Molecular cloning of LSIRF, a lymphoid-specific member of the interferon regulatory factor family that binds the interferon-stimulated response element (ISRE)*. Nucleic Acids Res, 1995. **23**(12): p. 2127-36.
66. Mittrucker, H.W., et al., *Requirement for the transcription factor LSIRF/IRF4 for mature B and T lymphocyte function*. Science, 1997. **275**(5299): p. 540-3.
67. Lohoff, M., et al., *Dysregulated T helper cell differentiation in the absence of interferon regulatory factor 4*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(18): p. 11808-12.
68. Brustle, A., et al., *The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4*. Nat Immunol, 2007. **8**(9): p. 958-66.
69. Huber, M., et al., *IRF4 is essential for IL-21-mediated induction, amplification, and stabilization of the Th17 phenotype*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(52): p. 20846-51.
70. Chen, Q., et al., *IRF-4-binding protein inhibits interleukin-17 and interleukin-21 production by controlling the activity of IRF-4 transcription factor*. Immunity, 2008. **29**(6): p. 899-911.
71. Moisan, J., et al., *Ets-1 is a negative regulator of Th17 differentiation*. J Exp Med, 2007. **204**(12): p. 2825-35.
72. Grenningloh, R., B.Y. Kang, and I.C. Ho, *Ets-1, a functional cofactor of T-bet, is essential for Th1 inflammatory responses*. J Exp Med, 2005. **201**(4): p. 615-26.
73. Ichiyama, K., et al., *Foxp3 inhibits RORgammat-mediated IL-17A mRNA transcription through direct interaction with RORgammat*. J Biol Chem, 2008. **283**(25): p. 17003-8.
74. Rouvier, E., et al., *CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene*. J Immunol, 1993. **150**(12): p. 5445-56.
75. Weaver, C.T., et al., *IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 821-52.
76. Moseley, T.A., et al., *Interleukin-17 family and IL-17 receptors*. Cytokine Growth Factor Rev, 2003. **14**(2): p. 155-74.
77. Langrish, C.L., et al., *IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation*. J Exp Med, 2005. **201**(2): p. 233-40.

78. Liang, S.C., et al., *An IL-17F/A heterodimer protein is produced by mouse Th17 cells and induces airway neutrophil recruitment*. J Immunol, 2007. **179**(11): p. 7791-9.
79. Wright, J.F., et al., *Identification of an interleukin 17F/17A heterodimer in activated human CD4+ T cells*. J Biol Chem, 2007. **282**(18): p. 13447-55.
80. Schwarzenberger, P., et al., *IL-17 stimulates granulopoiesis in mice: use of an alternate, novel gene therapy-derived method for in vivo evaluation of cytokines*. J Immunol, 1998. **161**(11): p. 6383-9.
81. Schwarzenberger, P., et al., *Requirement of endogenous stem cell factor and granulocyte-colony-stimulating factor for IL-17-mediated granulopoiesis*. J Immunol, 2000. **164**(9): p. 4783-9.
82. Kolls, J.K. and A. Linden, *Interleukin-17 family members and inflammation*. Immunity, 2004. **21**(4): p. 467-76.
83. Witowski, J., et al., *IL-17 stimulates intraperitoneal neutrophil infiltration through the release of GRO alpha chemokine from mesothelial cells*. J Immunol, 2000. **165**(10): p. 5814-21.
84. Nakae, S., et al., *Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses*. Immunity, 2002. **17**(3): p. 375-87.
85. Conti, H.R., et al., *Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis*. The Journal of experimental medicine, 2009. **206**(2): p. 299-311.
86. Ho, A.W., et al., *IL-17RC is required for immune signaling via an extended SEF/IL-17R signaling domain in the cytoplasmic tail*. Journal of immunology, 2010. **185**(2): p. 1063-70.
87. Kagami, S., et al., *IL-23 and IL-17A, but not IL-12 and IL-22, are required for optimal skin host defense against Candida albicans*. Journal of immunology, 2010. **185**(9): p. 5453-62.
88. Saijo, S., et al., *Dectin-2 recognition of alpha-mannans and induction of Th17 cell differentiation is essential for host defense against Candida albicans*. Immunity, 2010. **32**(5): p. 681-91.
89. Henningsson, L., et al., *Interleukin-17A during local and systemic Staphylococcus aureus-induced arthritis in mice*. Infection and immunity, 2010. **78**(9): p. 3783-90.
90. Puel, A., et al., *Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity*. Science, 2011. **332**(6025): p. 65-8.
91. Casanova, J.L. and L. Abel, *Primary immunodeficiencies: a field in its infancy*. Science, 2007. **317**(5838): p. 617-9.
92. Alcais, A., et al., *Life-threatening infectious diseases of childhood: single-gene inborn errors of immunity?* Annals of the New York Academy of Sciences, 2010. **1214**: p. 18-33.
93. Gaffen, S.L., *Structure and signalling in the IL-17 receptor family*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(8): p. 556-67.
94. Kotenko, S.V., et al., *Identification, cloning, and characterization of a novel soluble receptor that binds IL-22 and neutralizes its activity*. J Immunol, 2001. **166**(12): p. 7096-103.
95. Kotenko, S.V., et al., *Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10Rbeta) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes*. J Biol Chem, 2001. **276**(4): p. 2725-32.
96. Wolk, K., et al., *IL-22 increases the innate immunity of tissues*. Immunity, 2004. **21**(2): p. 241-54.
97. Liang, S.C., et al., *Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides*. J Exp Med, 2006. **203**(10): p. 2271-9.

98. Zenewicz, L.A. and R.A. Flavell, *IL-22 and inflammation: leukin' through a glass onion*. Eur J Immunol, 2008. **38**(12): p. 3265-8.
99. Colonna, M., *Interleukin-22-producing natural killer cells and lymphoid tissue inducer-like cells in mucosal immunity*. Immunity, 2009. **31**(1): p. 15-23.
100. Takatori, H., et al., *Lymphoid tissue inducer-like cells are an innate source of IL-17 and IL-22*. J Exp Med, 2009. **206**(1): p. 35-41.
101. Ma, H.L., et al., *IL-22 is required for Th17 cell-mediated pathology in a mouse model of psoriasis-like skin inflammation*. J Clin Invest, 2008. **118**(2): p. 597-607.
102. Zheng, Y., et al., *Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis*. Nature, 2007. **445**(7128): p. 648-51.
103. Geboes, L., et al., *Proinflammatory role of the Th17 cytokine interleukin-22 in collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice*. Arthritis Rheum, 2009. **60**(2): p. 390-5.
104. Munoz, M., et al., *Interleukin (IL)-23 mediates Toxoplasma gondii-induced immunopathology in the gut via matrixmetalloproteinase-2 and IL-22 but independent of IL-17*. J Exp Med, 2009. **206**(13): p. 3047-59.
105. Aujla, S.J., et al., *IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia*. Nat Med, 2008. **14**(3): p. 275-81.
106. Zheng, Y., et al., *Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens*. Nat Med, 2008. **14**(3): p. 282-9.
107. Pan, H., et al., *Hydrodynamic gene delivery of interleukin-22 protects the mouse liver from concanavalin A-, carbon tetrachloride-, and Fas ligand-induced injury via activation of STAT3*. Cell Mol Immunol, 2004. **1**(1): p. 43-9.
108. Pickert, G., et al., *STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing*. J Exp Med, 2009. **206**(7): p. 1465-72.
109. Radaeva, S., et al., *Interleukin 22 (IL-22) plays a protective role in T cell-mediated murine hepatitis: IL-22 is a survival factor for hepatocytes via STAT3 activation*. Hepatology, 2004. **39**(5): p. 1332-42.
110. Sugimoto, K., et al., *IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis*. J Clin Invest, 2008. **118**(2): p. 534-44.
111. Zenewicz, L.A., et al., *Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation*. Immunity, 2007. **27**(4): p. 647-59.
112. Sonnenberg, G.F., et al., *Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A*. J Exp Med, 2010.
113. Kreymborg, K., et al., *IL-22 is expressed by Th17 cells in an IL-23-dependent fashion, but not required for the development of autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol, 2007. **179**(12): p. 8098-104.
114. Coquet, J.M., et al., *IL-21 is produced by NKT cells and modulates NKT cell activation and cytokine production*. J Immunol, 2007. **178**(5): p. 2827-34.
115. Asao, H., et al., *Cutting edge: the common gamma-chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex*. J Immunol, 2001. **167**(1): p. 1-5.
116. Habib, T., et al., *The common gamma chain (gamma c) is a required signaling component of the IL-21 receptor and supports IL-21-induced cell proliferation via JAK3*. Biochemistry, 2002. **41**(27): p. 8725-31.

117. Brandt, K., et al., *Interleukin-21 inhibits dendritic cell activation and maturation*. Blood, 2003. **102**(12): p. 4090-8.
118. Caruso, R., et al., *IL-21 is highly produced in Helicobacter pylori-infected gastric mucosa and promotes gelatinases synthesis*. J Immunol, 2007. **178**(9): p. 5957-65.
119. Distler, J.H., et al., *Expression of interleukin-21 receptor in epidermis from patients with systemic sclerosis*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(3): p. 856-64.
120. Jin, H., et al., *Distinct activation signals determine whether IL-21 induces B cell costimulation, growth arrest, or Bim-dependent apoptosis*. J Immunol, 2004. **173**(1): p. 657-65.
121. Ozaki, K., et al., *Cloning of a type I cytokine receptor most related to the IL-2 receptor beta chain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(21): p. 11439-44.
122. Coquet, J.M., et al., *Cutting edge: IL-21 is not essential for Th17 differentiation or experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol, 2008. **180**(11): p. 7097-101.
123. Sonderegger, I., et al., *IL-21 and IL-21R are not required for development of Th17 cells and autoimmunity in vivo*. Eur J Immunol, 2008. **38**(7): p. 1833-8.
124. Holmdahl, R., *IL-21 and autoimmune disease--hypothesis and reality?* Eur J Immunol, 2008. **38**(7): p. 1800-2.
125. Wilson, N.J., et al., *Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(9): p. 950-7.
126. Hirota, K., et al., *Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model*. J Exp Med, 2007. **204**(12): p. 2803-12.
127. Martin, B., et al., *Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals*. Immunity, 2009. **31**(2): p. 321-30.
128. Kohler, R.E., et al., *A role for macrophage inflammatory protein-3 alpha/CC chemokine ligand 20 in immune priming during T cell-mediated inflammation of the central nervous system*. J Immunol, 2003. **170**(12): p. 6298-306.
129. Liston, A., et al., *Inhibition of CCR6 function reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis via effects on the priming phase of the immune response*. J Immunol, 2009. **182**(5): p. 3121-30.
130. Reboldi, A., et al., *C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE*. Nat Immunol, 2009. **10**(5): p. 514-23.
131. Elhofy, A., et al., *Mice deficient for CCR6 fail to control chronic experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Neuroimmunol, 2009. **213**(1-2): p. 91-9.
132. Villares, R., et al., *CCR6 regulates EAE pathogenesis by controlling regulatory CD4+ T-cell recruitment to target tissues*. Eur J Immunol, 2009. **39**(6): p. 1671-81.
133. Yamazaki, T., et al., *CCR6 regulates the migration of inflammatory and regulatory T cells*. J Immunol, 2008. **181**(12): p. 8391-401.
134. Happel, K.I., et al., *Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to Klebsiella pneumoniae infection*. J Immunol, 2003. **170**(9): p. 4432-6.
135. Yen, H.R., et al., *Tc17 CD8 T cells: functional plasticity and subset diversity*. J Immunol, 2009. **183**(11): p. 7161-8.
136. Shin, H.C., et al., *Expression of IL-17 in human memory CD45RO+ T lymphocytes and its regulation by protein kinase A pathway*. Cytokine, 1999. **11**(4): p. 257-66.

137. Michel, M.L., et al., *Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia*. J Exp Med, 2007. **204**(5): p. 995-1001.
138. Khader, S.A., et al., *IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge*. Nat Immunol, 2007. **8**(4): p. 369-77.
139. Shibata, K., et al., *Resident Vdelta1+ gammadelta T cells control early infiltration of neutrophils after Escherichia coli infection via IL-17 production*. J Immunol, 2007. **178**(7): p. 4466-72.
140. Mrabet-Dahbi, S., et al., *Murine mast cells secrete a unique profile of cytokines and prostaglandins in response to distinct TLR2 ligands*. Exp Dermatol, 2009. **18**(5): p. 437-44.
141. Song, C., et al., *IL-17-producing alveolar macrophages mediate allergic lung inflammation related to asthma*. J Immunol, 2008. **181**(9): p. 6117-24.
142. Li, L., et al., *IL-17 produced by neutrophils regulates IFN-gamma-mediated neutrophil migration in mouse kidney ischemia-reperfusion injury*. J Clin Invest, 2010. **120**(1): p. 331-42.
143. Ferretti, S., et al., *IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger*. J Immunol, 2003. **170**(4): p. 2106-12.
144. Lopez Kostka, S., et al., *IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice*. J Immunol, 2009. **182**(5): p. 3039-46.
145. Cua, D.J. and C.M. Tato, *Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system*. Nat Rev Immunol. **10**(7): p. 479-89.
146. Ribot, J.C., et al., *CD27 is a thymic determinant of the balance between interferon-gamma- and interleukin 17-producing gammadelta T cell subsets*. Nat Immunol, 2009. **10**(4): p. 427-36.
147. Jensen, K.D., et al., *Thymic selection determines gammadelta T cell effector fate: antigen-naïve cells make interleukin-17 and antigen-experienced cells make interferon gamma*. Immunity, 2008. **29**(1): p. 90-100.
148. Haas, J.D., et al., *CCR6 and NK1.1 distinguish between IL-17A and IFN-gamma-producing gammadelta effector T cells*. Eur J Immunol, 2009. **39**(12): p. 3488-97.
149. Passos, S.T., et al., *IL-6 promotes NK cell production of IL-17 during toxoplasmosis*. J Immunol. **184**(4): p. 1776-83.
150. Li, L., et al., *IL-17 produced by neutrophils regulates IFN-gamma-mediated neutrophil migration in mouse kidney ischemia-reperfusion injury*. J Clin Invest. **120**(1): p. 331-42.
151. Sutton, C.E., et al., *Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity*. Immunity, 2009. **31**(2): p. 331-41.
152. Broxmeyer, H.E., *Is interleukin 17, an inducible cytokine that stimulates production of other cytokines, merely a redundant player in a sea of other biomolecules?* J Exp Med, 1996. **183**(6): p. 2411-5.
153. Fossiez, F., et al., *T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines*. J Exp Med, 1996. **183**(6): p. 2593-603.
154. Chabaud, M. and P. Miossec, *The combination of tumor necrosis factor alpha blockade with interleukin-1 and interleukin-17 blockade is more effective for controlling synovial inflammation and bone resorption in an ex vivo model*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(6): p. 1293-303.

155. Chabaud, M., G. Page, and P. Miossec, *Enhancing effect of IL-1, IL-17, and TNF-alpha on macrophage inflammatory protein-3alpha production in rheumatoid arthritis: regulation by soluble receptors and Th2 cytokines*. J Immunol, 2001. **167**(10): p. 6015-20.
156. Lubberts, E., et al., *IL-4 gene therapy for collagen arthritis suppresses synovial IL-17 and osteoprotegerin ligand and prevents bone erosion*. J Clin Invest, 2000. **105**(12): p. 1697-710.
157. Katz, Y. and O. Nativ, *Interleukin-17 may have a central role in inflammatory joint diseases as a "fine-tuning" cytokine*. Isr Med Assoc J, 2000. **2 Suppl**: p. 21-2.
158. Kotake, S., et al., *IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis*. J Clin Invest, 1999. **103**(9): p. 1345-52.
159. Kim, K.W., et al., *Human rheumatoid synovial fibroblasts promote osteoclastogenic activity by activating RANKL via TLR-2 and TLR-4 activation*. Immunol Lett, 2007. **110**(1): p. 54-64.
160. Lubberts, E., et al., *Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(2): p. 650-9.
161. Nakae, S., et al., *Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice*. J Immunol, 2003. **171**(11): p. 6173-7.
162. Antonyamy, M.A., et al., *Evidence for a role of IL-17 in organ allograft rejection: IL-17 promotes the functional differentiation of dendritic cell progenitors*. J Immunol, 1999. **162**(1): p. 577-84.
163. Shimada, M., et al., *IL-6 secretion by human pancreatic periacinar myofibroblasts in response to inflammatory mediators*. J Immunol, 2002. **168**(2): p. 861-8.
164. Fujino, S., et al., *Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease*. Gut, 2003. **52**(1): p. 65-70.
165. Kurasawa, K., et al., *Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis*. Arthritis Rheum, 2000. **43**(11): p. 2455-63.
166. Matusevicius, D., et al., *Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis*. Mult Scler, 1999. **5**(2): p. 101-4.
167. Kuchroo, V.K., et al., *T cell response in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): role of self and cross-reactive antigens in shaping, tuning, and regulating the autopathogenic T cell repertoire*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 101-23.
168. Ferber, I.A., et al., *Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)*. J Immunol, 1996. **156**(1): p. 5-7.
169. Gran, B., et al., *IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination*. J Immunol, 2002. **169**(12): p. 7104-10.
170. Zhang, G.X., et al., *Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in IL-12 receptor-beta 2-deficient mice: IL-12 responsiveness is not required in the pathogenesis of inflammatory demyelination in the central nervous system*. J Immunol, 2003. **170**(4): p. 2153-60.
171. Cua, D.J., et al., *Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain*. Nature, 2003. **421**(6924): p. 744-8.
172. Korn, T., et al., *Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation*. Nat Med, 2007. **13**(4): p. 423-31.
173. Haak, S., et al., *IL-17A and IL-17F do not contribute vitally to autoimmune neuro-inflammation in mice*. J Clin Invest, 2009. **119**(1): p. 61-9.

174. Kebir, H., et al., *Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation*. Nat Med, 2007. **13**(10): p. 1173-5.
175. Luzzza, F., et al., *Up-regulation of IL-17 is associated with bioactive IL-8 expression in Helicobacter pylori-infected human gastric mucosa*. J Immunol, 2000. **165**(9): p. 5332-7.
176. Dubin, P.J. and J.K. Kolls, *Th17 cytokines and mucosal immunity*. Immunol Rev, 2008. **226**: p. 160-71.
177. O'Connor, W., Jr., L.A. Zenewicz, and R.A. Flavell, *The dual nature of T(H)17 cells: shifting the focus to function*. Nat Immunol. **11**(6): p. 471-6.
178. Ye, P., et al., *Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense*. J Exp Med, 2001. **194**(4): p. 519-27.
179. Happel, K.I., et al., *Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against Klebsiella pneumoniae*. J Exp Med, 2005. **202**(6): p. 761-9.
180. Huang, W., et al., *Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice*. J Infect Dis, 2004. **190**(3): p. 624-31.
181. Kelly, M.N., et al., *Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against Toxoplasma gondii infection*. Infect Immun, 2005. **73**(1): p. 617-21.
182. Umemura, M., et al., *IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin infection*. J Immunol, 2007. **178**(6): p. 3786-96.
183. Hou, W., H.S. Kang, and B.S. Kim, *Th17 cells enhance viral persistence and inhibit T cell cytotoxicity in a model of chronic virus infection*. J Exp Med, 2009. **206**(2): p. 313-28.
184. Molesworth-Kenyon, S.J., et al., *IL-17 receptor signaling influences virus-induced corneal inflammation*. J Leukoc Biol, 2008. **83**(2): p. 401-8.
185. Svensson, M., B. Stockinger, and M.J. Wick, *Bone marrow-derived dendritic cells can process bacteria for MHC-I and MHC-II presentation to T cells*. J Immunol, 1997. **158**(9): p. 4229-36.
186. Chattopadhyay, P.K., J. Yu, and M. Roederer, *A live-cell assay to detect antigen-specific CD4+ T cells with diverse cytokine profiles*. Nat Med, 2005. **11**(10): p. 1113-7.
187. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
188. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.
189. Gentleman, R.C., et al., *Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics*. Genome Biol, 2004. **5**(10): p. R80.
190. Lexberg, M.H., et al., *Th memory for interleukin-17 expression is stable in vivo*. Eur J Immunol, 2008. **38**(10): p. 2654-64.
191. Ouyang, W., J.K. Kolls, and Y. Zheng, *The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation*. Immunity, 2008. **28**(4): p. 454-67.
192. Schubert, D., et al., *Immunization with glucose-6-phosphate isomerase induces T cell-dependent peripheral polyarthritis in genetically unaltered mice*. J Immunol, 2004. **172**(7): p. 4503-9.

193. Bruns, L., et al., *Immunization with an immunodominant self-peptide derived from glucose-6-phosphate isomerase induces arthritis in DBA/1 mice*. Arthritis research & therapy, 2009. **11**(4): p. R117.
194. Frey, O., et al., *Inducible costimulator (ICOS) blockade inhibits accumulation of polyfunctional T helper 1/T helper 17 cells and mitigates autoimmune arthritis*. Annals of the rheumatic diseases, 2010. **69**(8): p. 1495-501.
195. Frey, O., et al., *Regulatory T cells control the transition from acute into chronic inflammation in glucose-6-phosphate isomerase-induced arthritis*. Annals of the rheumatic diseases, 2010. **69**(8): p. 1511-8.
196. Crowe, S.R., et al., *Uneven distribution of MHC class II epitopes within the influenza virus*. Vaccine, 2006. **24**(4): p. 457-67.
197. Hamada, H., et al., *Tc17, a unique subset of CD8 T cells that can protect against lethal influenza challenge*. J Immunol, 2009. **182**(6): p. 3469-81.
198. Laan, M., et al., *Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways*. Journal of immunology, 1999. **162**(4): p. 2347-52.
199. Uyttenhove, C. and J. Van Snick, *Development of an anti-IL-17A auto-vaccine that prevents experimental auto-immune encephalomyelitis*. Eur J Immunol, 2006. **36**(11): p. 2868-74.
200. Kohlmeier, J.E. and D.L. Woodland, *Immunity to respiratory viruses*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 61-82.
201. Brass, A.L., et al., *The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus*. Cell, 2009. **139**(7): p. 1243-54.
202. Seki, M., et al., *Immunokinetics in severe pneumonia due to influenza virus and bacteria coinfection in mice*. Eur Respir J, 2004. **24**(1): p. 143-9.
203. Sun, K. and D.W. Metzger, *Inhibition of pulmonary antibacterial defense by interferon-gamma during recovery from influenza infection*. Nat Med, 2008. **14**(5): p. 558-64.
204. Ansel, K.M., D.U. Lee, and A. Rao, *An epigenetic view of helper T cell differentiation*. Nature immunology, 2003. **4**(7): p. 616-23.
205. Lohning, M., A. Richter, and A. Radbruch, *Cytokine memory of T helper lymphocytes*. Adv Immunol, 2002. **80**: p. 115-81.
206. Roh, T.Y., et al., *The genomic landscape of histone modifications in human T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(43): p. 15782-7.
207. Wang, Z., et al., *Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome*. Nat Genet, 2008. **40**(7): p. 897-903.
208. Lee, G.R., et al., *T helper cell differentiation: regulation by cis elements and epigenetics*. Immunity, 2006. **24**(4): p. 369-79.
209. Akimzhanov, A.M., X.O. Yang, and C. Dong, *Chromatin remodeling of interleukin-17 (IL-17)-IL-17F cytokine gene locus during inflammatory helper T cell differentiation*. J Biol Chem, 2007. **282**(9): p. 5969-72.
210. Acosta-Rodriguez, E.V., et al., *Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(6): p. 639-46.
211. Suryani, S. and I. Sutton, *An interferon-gamma-producing Th1 subset is the major source of IL-17 in experimental autoimmune encephalitis*. J Neuroimmunol, 2007. **183**(1-2): p. 96-103.

212. Afkarian, M., et al., *T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells*. Nat Immunol, 2002. **3**(6): p. 549-57.
213. Mullen, A.C., et al., *Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection*. Science, 2001. **292**(5523): p. 1907-10.
214. Schulz, E.G., et al., *Sequential polarization and imprinting of type 1 T helper lymphocytes by interferon-gamma and interleukin-12*. Immunity, 2009. **30**(5): p. 673-83.
215. Szabo, S.J., et al., *Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells*. J Exp Med, 1997. **185**(5): p. 817-24.
216. Lohning, M., et al., *T1/ST2 expression is enhanced on CD4+ T cells from schistosome egg-induced granulomas: analysis of Th cell cytokine coexpression ex vivo*. Journal of immunology, 1999. **162**(7): p. 3882-9.
217. Hegazy, A.N., et al., *Interferons direct Th2 cell reprogramming to generate a stable GATA-3(+)T-bet(+) cell subset with combined Th2 and Th1 cell functions*. Immunity, 2010. **32**(1): p. 116-28.
218. Gocke, A.R., et al., *T-bet regulates the fate of Th1 and Th17 lymphocytes in autoimmunity*. Journal of immunology, 2007. **178**(3): p. 1341-8.
219. Mathur, A.N., et al., *T-bet is a critical determinant in the instability of the IL-17-secreting T-helper phenotype*. Blood, 2006. **108**(5): p. 1595-601.
220. Kurschus, F.C., et al., *Genetic proof for the transient nature of the Th17 phenotype*. European journal of immunology, 2010. **40**(12): p. 3336-46.
221. Komiyama, Y., et al., *IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol, 2006. **177**(1): p. 566-73.
222. Yang, X.O., et al., *Regulation of inflammatory responses by IL-17F*. J Exp Med, 2008. **205**(5): p. 1063-75.
223. Frentsch, M., et al., *Direct access to CD4+ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression*. Nat Med, 2005. **11**(10): p. 1118-24.
224. Huaman, M.C., et al., *Ex vivo cytokine and memory T cell responses to the 42-kDa fragment of Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 in vaccinated volunteers*. J Immunol, 2008. **180**(3): p. 1451-61.
225. Mittrucker, H.W., et al., *Poor correlation between BCG vaccination-induced T cell responses and protection against tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(30): p. 12434-9.
226. Stubbe, M., et al., *Characterization of a subset of antigen-specific human central memory CD4+ T lymphocytes producing effector cytokines*. Eur J Immunol, 2008. **38**(1): p. 273-82.
227. McGeachy, M.J., et al., *The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo*. Nat Immunol, 2009. **10**(3): p. 314-24.
228. Lee, Y.K., et al., *Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage*. Immunity, 2009. **30**(1): p. 92-107.
229. Lexberg, M.H., et al., *IFN-gamma and IL-12 synergize to convert in vivo generated Th17 into Th1/Th17 cells*. European journal of immunology, 2010. **40**(11): p. 3017-27.
230. Hirota, K., et al., *Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses*. Nature immunology, 2011. **12**(3): p. 255-63.
231. Bending, D., et al., *Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice*. J Clin Invest, 2009.

232. Nurieva, R., et al., *Cutting edge: in vitro generated Th17 cells maintain their cytokine expression program in normal but not lymphopenic hosts*. J Immunol, 2009. **182**(5): p. 2565-8.
233. Croxford, A.L., F.C. Kurschus, and A. Waisman, *Cutting edge: an IL-17F-CreEYFP reporter mouse allows fate mapping of Th17 cells*. J Immunol, 2009. **182**(3): p. 1237-41.
234. Chang, S.H. and C. Dong, *IL-17F: regulation, signaling and function in inflammation*. Cytokine, 2009. **46**(1): p. 7-11.
235. McGeachy, M.J., et al., *TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology*. Nat Immunol, 2007. **8**(12): p. 1390-7.
236. Wei, G., et al., *Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4+ T cells*. Immunity, 2009. **30**(1): p. 155-67.
237. Pepper, M., et al., *Different routes of bacterial infection induce long-lived TH1 memory cells and short-lived TH17 cells*. Nature immunology, 2010. **11**(1): p. 83-9.
238. Lamb, R.A. and R.M. Krug, *Orthomyxoviridae: The viruses and their replication*. Fourth Edition ed. 2001, Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
239. Skehel, J.J., et al., *Membrane fusion by influenza hemagglutinin*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1995. **60**: p. 573-80.
240. Sieczkarski, S.B., H.A. Brown, and G.R. Whittaker, *Role of protein kinase C beta1 in influenza virus entry via late endosomes*. J Virol, 2003. **77**(1): p. 460-9.
241. Bouloy, M., S.J. Plotch, and R.M. Krug, *Globin mRNAs are primers for the transcription of influenza viral RNA in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(10): p. 4886-90.
242. Takaoka, A. and H. Yanai, *Interferon signalling network in innate defence*. Cell Microbiol, 2006. **8**(6): p. 907-22.
243. Asselin-Paturel, C., et al., *Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology*. Nat Immunol, 2001. **2**(12): p. 1144-50.
244. Kumagai, Y., et al., *Alveolar macrophages are the primary interferon-alpha producer in pulmonary infection with RNA viruses*. Immunity, 2007. **27**(2): p. 240-52.
245. Sweet, C. and H. Smith, *Pathogenicity of influenza virus*. Microbiological reviews, 1980. **44**(2): p. 303-30.
246. Stark, M.A., et al., *Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17*. Immunity, 2005. **22**(3): p. 285-94.
247. Romani, L., et al., *Defective tryptophan catabolism underlies inflammation in mouse chronic granulomatous disease*. Nature, 2008. **451**(7175): p. 211-5.
248. Lockhart, E., A.M. Green, and J.L. Flynn, *IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during Mycobacterium tuberculosis infection*. J Immunol, 2006. **177**(7): p. 4662-9.
249. Carding, S.R. and P.J. Egan, *Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(5): p. 336-45.
250. Roark, C.L., et al., *Exacerbation of collagen-induced arthritis by oligoclonal, IL-17-producing gamma delta T cells*. Journal of immunology, 2007. **179**(8): p. 5576-83.
251. Cui, Y., et al., *Major role of gamma delta T cells in the generation of IL-17+ uveitogenic T cells*. Journal of immunology, 2009. **183**(1): p. 560-7.

252. Aujla, S.J., P.J. Dubin, and J.K. Kolls, *Th17 cells and mucosal host defense*. Seminars in immunology, 2007. **19**(6): p. 377-82.
253. Flierl, M.A., et al., *Adverse functions of IL-17A in experimental sepsis*. FASEB J, 2008. **22**(7): p. 2198-205.
254. Ito, Y., et al., *Gamma/delta T cells are the predominant source of interleukin-17 in affected joints in collagen-induced arthritis, but not in rheumatoid arthritis*. Arthritis and rheumatism, 2009. **60**(8): p. 2294-303.
255. Flynn, K.J., et al., *Virus-specific CD8+ T cells in primary and secondary influenza pneumonia*. Immunity, 1998. **8**(6): p. 683-91.
256. Carding, S.R., et al., *Activation of cytokine genes in T cells during primary and secondary murine influenza pneumonia*. J Exp Med, 1993. **177**(2): p. 475-82.
257. Mayer, K.D., et al., *The functional heterogeneity of type 1 effector T cells in response to infection is related to the potential for IFN-gamma production*. J Immunol, 2005. **174**(12): p. 7732-9.
258. Xu, L., et al., *Cutting edge: pulmonary immunopathology mediated by antigen-specific expression of TNF-alpha by antiviral CD8+ T cells*. J Immunol, 2004. **173**(2): p. 721-5.
259. Topham, D.J., R.A. Tripp, and P.C. Doherty, *CD8+ T cells clear influenza virus by perforin or Fas-dependent processes*. J Immunol, 1997. **159**(11): p. 5197-200.
260. Eichelberger, M., et al., *Clearance of influenza virus respiratory infection in mice lacking class I major histocompatibility complex-restricted CD8+ T cells*. J Exp Med, 1991. **174**(4): p. 875-80.
261. Crowe, C.R., et al., *Critical role of IL-17RA in immunopathology of influenza infection*. J Immunol, 2009. **183**(8): p. 5301-10.
262. Hoshino, H., et al., *Increased elastase and myeloperoxidase activity associated with neutrophil recruitment by IL-17 in airways in vivo*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **105**(1 Pt 1): p. 143-9.
263. Lagasse, E. and I.L. Weissman, *Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes*. J Immunol Methods, 1996. **197**(1-2): p. 139-50.
264. Hirsch, S. and S. Gordon, *Polymorphic expression of a neutrophil differentiation antigen revealed by monoclonal antibody 7/4*. Immunogenetics, 1983. **18**(3): p. 229-39.
265. Henderson, R.B., et al., *Rapid recruitment of inflammatory monocytes is independent of neutrophil migration*. Blood, 2003. **102**(1): p. 328-35.
266. Ratcliffe, D.R., S.L. Nolin, and E.B. Cramer, *Neutrophil interaction with influenza-infected epithelial cells*. Blood, 1988. **72**(1): p. 142-9.
267. Hashimoto, Y., et al., *Evidence for phagocytosis of influenza virus-infected, apoptotic cells by neutrophils and macrophages in mice*. J Immunol, 2007. **178**(4): p. 2448-57.
268. Tate, M.D., et al., *The role of neutrophils during mild and severe influenza virus infections of mice*. PLoS One, 2011. **6**(3): p. e17618.
269. Fleming, T.J., M.L. Fleming, and T.R. Malek, *Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family*. J Immunol, 1993. **151**(5): p. 2399-408.
270. Matsuzaki, J., et al., *Successful elimination of memory-type CD8+ T cell subsets by the administration of anti-Gr-1 monoclonal antibody in vivo*. Cell Immunol, 2003. **224**(2): p. 98-105.
271. Tate, M.D., A.G. Brooks, and P.C. Reading, *The role of neutrophils in the upper and lower respiratory tract during influenza virus infection of mice*. Respir Res, 2008. **9**: p. 57.

272. Tate, M.D., et al., *Neutrophils ameliorate lung injury and the development of severe disease during influenza infection*. J Immunol, 2009. **183**(11): p. 7441-50.
273. Aldridge, A.J., *Role of the neutrophil in septic shock and the adult respiratory distress syndrome*. Eur J Surg, 2002. **168**(4): p. 204-14.
274. Sakai, S., et al., *Therapeutic effect of anti-macrophage inflammatory protein 2 antibody on influenza virus-induced pneumonia in mice*. J Virol, 2000. **74**(5): p. 2472-6.
275. Liang, S.C., et al., *An IL-17F/A heterodimer protein is produced by mouse Th17 cells and induces airway neutrophil recruitment*. Journal of immunology, 2007. **179**(11): p. 7791-9.
276. Allan, W., et al., *Cellular events in the lymph node and lung of mice with influenza. Consequences of depleting CD4+ T cells*. Journal of immunology, 1990. **144**(10): p. 3980-6.
277. Scherle, P.A. and W. Gerhard, *Functional analysis of influenza-specific helper T cell clones in vivo. T cells specific for internal viral proteins provide cognate help for B cell responses to hemagglutinin*. The Journal of experimental medicine, 1986. **164**(4): p. 1114-28.
278. Mozdzanowska, K., et al., *Roles of CD4+ T-cell-independent and -dependent antibody responses in the control of influenza virus infection: evidence for noncognate CD4+ T-cell activities that enhance the therapeutic activity of antiviral antibodies*. Journal of virology, 2005. **79**(10): p. 5943-51.
279. Mozdzanowska, K., K. Maiese, and W. Gerhard, *Th cell-deficient mice control influenza virus infection more effectively than Th- and B cell-deficient mice: evidence for a Th-independent contribution by B cells to virus clearance*. Journal of immunology, 2000. **164**(5): p. 2635-43.
280. Shimomura, E., F. Suzuki, and N. Ishida, *Characterization of cells infiltrating the lungs of x-irradiated and nude mice after influenza virus infection*. Microbiology and immunology, 1982. **26**(2): p. 129-38.
281. Wells, M.A., F.A. Ennis, and P. Albrecht, *Recovery from a viral respiratory infection. II. Passive transfer of immune spleen cells to mice with influenza pneumonia*. Journal of immunology, 1981. **126**(3): p. 1042-6.
282. Moskophidis, D. and D. Kioussis, *Contribution of virus-specific CD8+ cytotoxic T cells to virus clearance or pathologic manifestations of influenza virus infection in a T cell receptor transgenic mouse model*. The Journal of experimental medicine, 1998. **188**(2): p. 223-32.
283. Nguyen, H.H., et al., *Gamma interferon is not required for mucosal cytotoxic T-lymphocyte responses or heterosubtypic immunity to influenza A virus infection in mice*. J Virol, 2000. **74**(12): p. 5495-501.
284. Bot, A., S. Bot, and C.A. Bona, *Protective role of gamma interferon during the recall response to influenza virus*. Journal of virology, 1998. **72**(8): p. 6637-45.
285. Baumgarth, N. and A. Kelso, *In vivo blockade of gamma interferon affects the influenza virus-induced humoral and the local cellular immune response in lung tissue*. J Virol, 1996. **70**(7): p. 4411-8.
286. Price, G.E., A. Gaszewska-Mastarlarz, and D. Moskophidis, *The role of alpha/beta and gamma interferons in development of immunity to influenza A virus in mice*. J Virol, 2000. **74**(9): p. 3996-4003.
287. Sun, J., et al., *Effector T cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing IL-10*. Nat Med, 2009. **15**(3): p. 277-84.
288. Ye, P., et al., *Interleukin-17 and lung host defense against Klebsiella pneumoniae infection*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001. **25**(3): p. 335-40.

289. Kopf, M., F. Brombacher, and M.F. Bachmann, *Role of IgM antibodies versus B cells in influenza virus-specific immunity*. Eur J Immunol, 2002. **32**(8): p. 2229-36.
290. Palladino, G., et al., *Virus-neutralizing antibodies of immunoglobulin G (IgG) but not of IgM or IgA isotypes can cure influenza virus pneumonia in SCID mice*. J Virol, 1995. **69**(4): p. 2075-81.
291. Ishigame, H., et al., *Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucoc epithelial bacterial infection and allergic responses*. Immunity, 2009. **30**(1): p. 108-19.
292. Inoue, D., et al., *IL-17A promotes the growth of airway epithelial cells through ERK-dependent signaling pathway*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **347**(4): p. 852-8.
293. Trajkovic, V., et al., *Interleukin-17 stimulates inducible nitric oxide synthase activation in rodent astrocytes*. J Neuroimmunol, 2001. **119**(2): p. 183-91.
294. Julkunen, I., et al., *Inflammatory responses in influenza A virus infection*. Vaccine, 2000. **19 Suppl 1**: p. S32-7.
295. Matsukura, S., et al., *Expression of IL-6, IL-8, and RANTES on human bronchial epithelial cells, NCI-H292, induced by influenza virus A*. The Journal of allergy and clinical immunology, 1996. **98**(6 Pt 1): p. 1080-7.
296. Adachi, M., et al., *Expression of cytokines on human bronchial epithelial cells induced by influenza virus A*. International archives of allergy and immunology, 1997. **113**(1-3): p. 307-11.
297. Sprenger, H., et al., *Selective induction of monocyte and not neutrophil-attracting chemokines after influenza A virus infection*. The Journal of experimental medicine, 1996. **184**(3): p. 1191-6.
298. Bussefeld, D., et al., *Differential mononuclear leukocyte attracting chemokine production after stimulation with active and inactivated influenza A virus*. Cellular immunology, 1998. **186**(1): p. 1-7.
299. Bermejo-Martin, J.F., et al., *Th1 and Th17 hypercytokinemia as early host response signature in severe pandemic influenza*. Crit Care, 2009. **13**(6): p. R201.
300. de Castro, I.F., et al., *First evidence of a pro-inflammatory response to severe infection with influenza virus H1N1*. Crit Care, 2010. **14**(1): p. 115.
301. Haller, O., P. Staeheli, and G. Kochs, *Protective role of interferon-induced Mx GTPases against influenza viruses*. Revue scientifique et technique, 2009. **28**(1): p. 219-31.
302. Nakhaei, P., et al., *RIG-I-like receptors: sensing and responding to RNA virus infection*. Seminars in immunology, 2009. **21**(4): p. 215-22.
303. Haller, O., P. Staeheli, and G. Kochs, *Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense*. Biochimie, 2007. **89**(6-7): p. 812-8.
304. Silverman, R.H., *Fascination with 2-5A-dependent RNase: a unique enzyme that functions in interferon action*. Journal of interferon research, 1994. **14**(3): p. 101-4.
305. Zhou, A., et al., *Interferon action and apoptosis are defective in mice devoid of 2',5'-oligoadenylate-dependent RNase L*. The EMBO journal, 1997. **16**(21): p. 6355-63.
306. Williams, B.R., *PKR; a sentinel kinase for cellular stress*. Oncogene, 1999. **18**(45): p. 6112-20.
307. Friedman, R.L., et al., *Transcriptional and posttranscriptional regulation of interferon-induced gene expression in human cells*. Cell, 1984. **38**(3): p. 745-55.
308. Lewin, A.R., et al., *Molecular analysis of a human interferon-inducible gene family*. European journal of biochemistry / FEBS, 1991. **199**(2): p. 417-23.

309. Bange, F.C., et al., *IFP 35 is an interferon-induced leucine zipper protein that undergoes interferon-regulated cellular redistribution*. The Journal of biological chemistry, 1994. **269**(2): p. 1091-8.
310. Tan, J., et al., *IFP35 is involved in the antiviral function of interferon by association with the viral tas transactivator of bovine foamy virus*. Journal of virology, 2008. **82**(9): p. 4275-83.
311. Ohbayashi, H., *Matrix metalloproteinases in lung diseases*. Current protein & peptide science, 2002. **3**(4): p. 409-21.
312. Vandenbroucke, R.E., E. Dejonckheere, and C. Libert, *A therapeutic role for MMP inhibitors in lung diseases?* The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology, 2011.
313. Qiu, Z., et al., *Interleukin-17 regulates chemokine and gelatinase B expression in fibroblasts to recruit both neutrophils and monocytes*. Immunobiology, 2009. **214**(9-10): p. 835-42.
314. von Vietinghoff, S. and K. Ley, *IL-17A controls IL-17F production and maintains blood neutrophil counts in mice*. J Immunol, 2009. **183**(2): p. 865-73.
315. LeVine, A.M., V. Koeningsknecht, and J.M. Stark, *Decreased pulmonary clearance of S. pneumoniae following influenza A infection in mice*. Journal of virological methods, 2001. **94**(1-2): p. 173-86.
316. McCullers, J.A. and K.C. Bartmess, *Role of neuraminidase in lethal synergism between influenza virus and Streptococcus pneumoniae*. The Journal of infectious diseases, 2003. **187**(6): p. 1000-9.
317. Miettinen, M., et al., *IFNs activate toll-like receptor gene expression in viral infections*. Genes and immunity, 2001. **2**(6): p. 349-55.
318. Didierlaurent, A., et al., *Sustained desensitization to bacterial Toll-like receptor ligands after resolution of respiratory influenza infection*. The Journal of experimental medicine, 2008. **205**(2): p. 323-9.
319. Goulding, J., et al., *Respiratory infections: do we ever recover?* Proceedings of the American Thoracic Society, 2007. **4**(8): p. 618-25.
320. Shahangian, A., et al., *Type I IFNs mediate development of postinfluenza bacterial pneumonia in mice*. The Journal of clinical investigation, 2009. **119**(7): p. 1910-20.
321. Lu, Y.J., et al., *Interleukin-17A mediates acquired immunity to pneumococcal colonization*. PLoS pathogens, 2008. **4**(9): p. e1000159.
322. Kolls, J.K., P. Ye, and J.E. Shellito, *Gene therapy to modify pulmonary host defenses*. Seminars in respiratory infections, 2001. **16**(1): p. 18-26.
323. Kudva, A., et al., *Influenza A inhibits Th17-mediated host defense against bacterial pneumonia in mice*. Journal of immunology, 2011. **186**(3): p. 1666-74.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. Darstellung der verschiedenen T-Helferzell-Subpopulationen.	2
Abb. 2. Das transkriptionelle regulatorische Netzwerk der T _H 17-Differenzierung.	7
Abb. 3. <i>Gating</i> Strategie zur Sortierung von CD4 ⁺ CD62L ⁺ IL-17 ⁺ und CD4 ⁺ CD62L ⁺ IL-17 ⁺ T-Zellen mittels FACS Aria.	28
Abb. 4. Sortierung naiver T _H -Zellen mithilfe des anti-FITC MultiSort Kits.	30
Abb. 5. DNA-Größenstandard <i>1kb DNA Ladder</i> von Genecraft.	32
Abb. 6. <i>In vitro</i> generierte T _H 17-Zellen sind stabil unter wiederholten T _H 17-Bedingungen.	39
Abb. 7. <i>In vitro</i> generierte T _H 17-Zellen konvertieren zu T _H 1-Zellen unter T _H 1-polarisierenden Bedingungen.	40
Abb. 8. Unterschiedliche Restimulationszeiten mit PMA und Ionomycin und deren Auswirkung auf die IL-17-Produktion.	42
Abb. 9. Intrazelluläre Färbung als Kontrolle für den IL-17 CSA.	43
Abb. 10. <i>Gating</i> Strategie zur Sortierung der CD4 ⁺ CD62L ⁺ IL-17 ⁺ T-Zellen mittels FACS Aria und Re-analyse der IL-17-positiven bzw.-negativen Population.	44
Abb. 11. Zytokinexpression der T _H 17-Zellen <i>ex vivo</i> G6PI-immunisierter Mäuse nach 6 Tagen unter definierten Kulturbedingungen.	45
Abb. 12. Klinischer Verlauf der EAE in C57BL/6 Mäusen.	46
Abb. 13. Restimulationsbedingungen für die Sortierung von T _H 17-Zellen <i>ex vivo</i> MOG ₃₅₋₅₅ -immunisierter Mäuse am Tag 7.	47
Abb. 14. Intrazelluläre Zytokinfärbung der Splenozyten am Tag 7 nach MOG ₃₅₋₅₅ -Immunisierung.	48
Abb. 15. Zytokinexpression der T _H 17-Zellen <i>ex vivo</i> MOG ₃₅₋₅₅ -immunisierter Mäuse in der Induktionsphase nach definierten Kulturbedingungen. In C57BL/6 Mäusen wurde eine EAE induziert.	49
Abb. 16. Relative mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren in T _H 17-Zellen isoliert aus MOG ₃₅₋₅₅ -immunisierten Mäusen in der Induktionsphase nach definierten Kulturbedingungen.	50
Abb. 17. Klinischer Score, Überleben und Inzidenz der Mäuse in der Effektorphase der EAE.	51
Abb. 18. Sortierung der CD4 ⁺ CD62L ⁺ IL-17 ⁺ T-Zellen aus dem ZNS EAE-erkrankter Mäuse.	52
Abb. 19. Intrazelluläre Zytokinfärbung der Lymphozyten isoliert aus dem ZNS MOG ₃₅₋₅₅ -immunisierter Mäuse am Tag 14.	52
Abb. 20. Zytokinexpression der T _H 17-Zellen <i>ex vivo</i> MOG ₃₅₋₅₅ -immunisierter Mäuse in der Effektorphase nach definierten Kulturbedingungen.	53
Abb. 21. Zahl der Leukozyten und neutrophiler Granulozyten nach Influenzavirus Infektion.	54
Abb. 22. Charakterisierung der Zellpopulationen in der Lunge der Influenzavirus-infizierten Mäuse.	55
Abb. 23. Zahl der CD4 ⁺ , CD8 ⁺ , γδ, NK1.1 ⁺ T-Zellen sowie NK1.1 ⁺ Zellen in der Lunge der Influenzavirus-infizierten Mäuse.	56
Abb. 24. Zytokinexpression in der Lunge am Tag 1 nach Influenzavirus Infektion. C57BL/6 Mäuse wurden mit 30 pfu H1N1 i.n. infiziert.	57
Abb. 25. IL-17-Produzenten in der Lunge der Influenzavirus-infizierten Mäuse.	58
Abb. 26. Antigen-spezifische Zytokinproduktion der CD4 ⁺ T-Zellen in der Lunge der Influenzavirus-infizierten Mäuse.	59
Abb. 27. Antigen-spezifische Zytokinproduktion der CD8 ⁺ T-Zellen in der Lunge der Influenzavirus-infizierten Mäuse.	60
Abb. 28. Auswirkung der IL-17 – Blockade auf Körpergewicht und Überleben der Mäuse nach H1N1-Infektion.	61
Abb. 29. Auswirkung der IL-17 – Blockade auf das Körpergewicht der Mäuse nach einer sublethalen Infektionsdosis H1N1.	62
Abb. 30. Auswirkung der IL-17 – Blockade auf die Viruslast in Influenzavirus-infizierten Mäusen.	63
Abb. 32. Neutrophile Granulozyten im peripheren Blut und in der Lunge Influenzavirus-infizierter Mäuse nach IL-17 – Blockade.	64
Abb. 33. Anti-IL-17-Applikation verhindert die Infiltration neutrophiler Granulozyten in das Lungengewebe Influenzavirus-infizierter Mäuse.	65
Abb. 34. IL-17 – Blockade reduziert den Schweregrad der <i>Bronchiolitis obliterans</i> nach Influenzavirus Infektion.	66
Abb. 35. Depletion neutrophiler Granulozyten in H1N1-infizierten Mäusen.	67
Abb. 36. Zahl der Leukozyten in Lunge und Milz am Tag 4 und 7 nach Influenzavirus Infektion.	68
Abb. 37. Zahl der CD4 ⁺ , CD8 ⁺ und γδ T-Zellen sowie NK1.1 ⁺ Zellen in Lunge und Milz am Tag 7 nach Influenzavirus Infektion.	69
Abb. 38. IFN-γ-, IL-17- und IL-10-produzierende CD4 ⁺ , CD8 ⁺ und γδ T-Zellen sowie NK1.1 ⁺ Zellen in der Lunge am Tag 7 p.i.	70

Abb. 39. Nachweis Influenza-spezifischer Antikörper im Serum H1N1-infizierter Mäuse nach IL-17 – Blockade.	71
Abb. 40. Qualitätskontrolle der isolierten RNA anhand der Visualisierung der 18S- und 28S-rRNA.....	72
Abb. 41. Venn-Diagramme der Lunge nach H1N1-Infektion (Kontrolle und anti-IL-17-Applikation).....	74
Abb. 42. Venn-Diagramm der Lunge der Kontroll- und der anti-IL-17-behandelten H1N1-infizierten Tiere.. ..	75
Abb. 43. Krankheitsverlauf in C57BL/6_IL-17 ko Mäusen nach Influenzavirus Infektion.	79
Abb. 44. Infiltration der Lunge in H1N1-infizierten C57BL/6_IL-17 ko Mäusen.	80
Abb. 45. Bestimmung der optimalen Infektionsdosen für die sekundär bakterielle Infektion.....	81
Abb. 46. Einfluss der anti-IL-17-Applikation auf den Krankheitsverlauf einer Doppelinfektion.	82

Tabellenverzeichnis

Tab. 1. Expression und bekannte Funktionen der Mitglieder der IL-17 Zytokinfamilie.	9
Tab. 2. Bezeichnung und Beschreibung der verwendeten anti-Maus Fluorochrom-konjugierten Antikörper für die Sortierung von Zellen mithilfe des AutoMACS® Separator und FACSAria™ mit der eingesetzten Verdünnung und deren Herkunft.	16
Tab. 3. Bezeichnung der verwendeten MicoBeads für die Sortierung von Zellen mithilfe des AutoMACS® Separator.	17
Tab. 4. Bezeichnung und Beschreibung der verwendeten Antikörper für Oberflächen- und intrazelluläre Färbung mittels FACS und deren Herkunft.	17
Tab. 5. Bezeichnung und Beschreibung der verwendeten Antikörper für immunhistochemischen Färbungen sowie deren Herkunft.	18
Tab. 6. Bezeichnung und Beschreibung der verwendeten Antikörper für Isotyp ELISA mit der eingesetzten Verdünnung und deren Herkunft.	18
Tab. 7. Bezeichnung und Beschreibung der verwendeten Antikörper für die Zellkultur mit der eingesetzten Konzentration und deren Herkunft.	18
Tab. 8. Bezeichnung und Beschreibung der verwendeten Antikörper für <i>in vivo</i> Experimente mit deren Herkunft.	19
Tab. 9. Bezeichnung und Beschreibung der verwendeten Zytokine für die Kultivierung von T-Zellen sowie deren Herkunft und die eingesetzten Konzentrationen.	19
Tab. 10. Setup des verwendeten Durchflusszytometers BD LSR II und die Fluorochrome, die gemessen werden können.	24
Tab. 11. Ausbeute und Reinheit der aus den Milzen G6PI-immunisierter Mäuse isolierten T _H 17-Zellen..	43
Tab. 12. Ausbeute und Reinheit der T _H 17-Zellen aus den Milzen MOG ₃₅₋₅₅ -immunisierten Mäuse am Tag 7.	48
Tab. 14. Schweregrad der <i>Bronchiolitis obliterans</i>	67
Tab. 15. <i>Top Canonical Pathways</i> in der Lunge im direkten Vergleich zwischen der Kontrollgruppe (Maus-IgG) und der anti-IL-17-behandelte Gruppe am Tag 2 nach Infektion.	75
Tab. 16. Verstärkte Expression von Genen im direkten Vergleich zwischen „Kontrolle d2 vs. anti-IL-17 d2“	77
Tab. 17. Reduzierte Expression von Genen im direkten Vergleich zwischen „Kontrolle d2 vs. anti-IL-17 d2“	78

Wissenschaftliche Beiträge

PUBLIKATIONEN

Lexberg MH, **Taubner A**, Albrecht I, Richter A, Förster A, Kamradt T, Radbruch A, Chang HD. Th memory for interleukin-17 is stable in vivo. Eur J Immunol. 2008 Oct;38(10):2654-64.

Lexberg MH, **Taubner A**, Albrecht I, Lepenies I, Richter A, Kamradt T, Radbruch A, Chang HD. IFN- γ and IL-12 synergize to convert in vivo generated Th17 cells into Th1/Th17 cells. Eur J Immunol. 2010 Nov; 40(11):3017-27.

POSTER

Taubner A, Frey O, Heink S, Sparwasser T, Kamradt T: Inhibition of T_H17 cells by IL-2.
September 2008, Wien, Joint Annual meeting of immunology of the German Austrian Societies of Immunology

Taubner A, Frey O, Heink S, Sparwasser T, Kamradt T: Inhibition of T_H17 cells by IL-2.
September 2008, Berlin, 36. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie

Taubner A, Lexberg MH, Förster A, Albrecht I, Richter A, Heink S, Radbruch A, Chang HD, Kamradt T: Stability and plasticity of T_H17 cells *in vitro* and *in vivo*.
Dezember 2008, Paris, One day meeting organised by GREMI: T_H17-derived cytokines: New kids on the block of inflammation.

Taubner A, Henke A, Wiesener N, Uyttenhove C, Weih D, Frappart L, Bläss M, Kohl M, Bauer M, Kamradt T: IL-17 regulates lung pathology following influenza virus infection.
September 2010, Leipzig, 40. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie.

VORTRÄGE

Taubner A, Henke A, Wiesener N, Uyttenhove C, Weih D, Kamradt T: IL-17 regulates lung inflammation during influenza virus infection.
September 2009, Berlin, 2nd European Congress of Immunology.

Taubner A, Henke A, Wiesener N, Uyttenhove C, Weih D, Frappart L, Bläss M, Kohl M, Bauer M, Kamradt T: IL-17 regulates lung pathology following influenza virus infection.
September 2010, Leipzig, 40. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie.

Danksagung

Diese Seite meiner Dissertation widme ich allen Leuten, die mir in und während dieser Zeit so hilfsbereit und unterstützend zur Seite gestanden haben! Ohne euch würde es diese Arbeit nicht geben.

In erster Linie möchte ich Herrn Prof. Thomas Kamradt für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, sowie für die Betreuung, die Unterstützung und die mir gewidmeten Freiräume danken.

Allen Mitarbeiter des Instituts für Immunologie danke ich von Herzen für ihre Hilfe!

Vielen Dank Annett Krause, dass die Tür in deinem Büro immer offen war (und ist) und wir gemeinsam Probleme jeglicher Art lösen konnten und können!

Christine Baier, Christine Schulze, Manuela Neumann, Karin Müller und Freya Rost danke ich für die unermüdliche Produktion von Antikörpern, die aufgefüllten Schränke, die vielen PCRs.... Vielen Dank Olga Rudeschko für das Sortieren der Zellen, auch wenn dies oft länger als üblich dauerte und du zeitlich so flexibel warst.

Mein ganz besonderer Dank geht an meine Kollegen Jenny Freitag, Lisa Bruns, Luciana Berod, Sylvia Heink, Sebastian Drube, Ingo Irmeler, Maria Eschke, Birgit Lehmann, Sabine Walter, Sebastian Berg und Frederike Schmitz, die mich in experimentellen Arbeiten und auch im Maushaus unterstützt haben – aber vor allem für die vielen *social events*, die diese Zeit so großartig gemacht haben. Vielen Dank für den Kaffee mit dem allerbesten Milchschaum und die unzähligen „Schokkobrötchen“.

Tausend Dank an Jenny (Alexander, Christiane Göpfert und auch meiner Schwester Juliane) fürs Korrekturlesen der Arbeit!

Vielen Dank an alle Mitarbeiter des IVTK, die dafür sorgten, dass meine Mäuse immer genug Futter und frisches Wasser hatten.

Prof. Andreas Henke, Nadine Wiesener und Heike Urban danke ich für die fantastische Zusammenarbeit. Ohne eure große Hilfe hätten meine Mäuse nie Schnupfen bekommen.

Ein besonderer Dank geht an Maria Lexberg, Hyun-Dong Chang und Prof. Andreas Radbruch – vielen Dank für die tolle Kooperation.

Bei Markus Bläss bedanke ich mich riesig für die Durchführung der Microarrays und bei Matthias Kohl für die statistischen Auswertungen.

Desweiteren möchte ich mich ganz herzlich bei Katrin Reppe und Dr. Martin Witzenrath für die Infektion der Mäuse mit *Streptococcus pneumoniae* bedanken.

Debbie Weih danke ich besonders für die Unterstützung und notwendige Hilfe in Sachen Histologien. Bei Lucien Frappart bedanke ich mich für die Begutachtung und Bewertung der Histologien.

Ein besonderer Dank gilt Prof. Falk Weih für die Betreuung meiner Arbeit.

Bei Manuela Gabler bedanke ich mich für die Weiterführung des Influenza Projektes am Institut für Immunologie – auch wenn es eigentlich gar nichts mit deinem eigenen Projekt zu tun hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen neuen Kollegen bei Miltenyi – insbesondere Christoph Vess – für das gute Zureden und die Nachsichtigkeit.

Last but not least bedanke ich mich bei Rico, meinen Freunden und besonders auch meiner Familie – vor allem für das Verständnis meiner persönlichen Ziele, die unermüdliche Geduld mit mir (Danke Rico – ich weiß es zu schätzen) und die aufmunternden und motivierenden Worte diese Arbeit endlich zum Ende zu bringen.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Desweiteren erkläre ich, dass ich die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen habe und Dritte im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir erhalten haben.

Die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena ist mir bekannt und die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung wurde von mir nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Jena, den
